



**VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ - TECHNICKÁ UNIVERZITA  
OSTRAVA UNIVERZITNÍ STUDIJNÍ PROGRAMY**

**Příprava submikronových částic a nanočástic  
vybraných léčiv**

Preparation of submicron particles and nanoparticles  
selected pharmaceuticals

Jméno studenta:

**Lukášová Tereza**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**

**2016 Ostrava**

## Zadání bakalářské práce

Student: **Tereza Lukášová**  
Studijní program: B3942 Nanotechnologie  
Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie  
Téma: **Příprava submikronových částic a nanočástic vybraných léčiv**  
**Preparation of submicron particles and nanoparticles selected pharmaceuticals**  
Jazyk vypracování: čeština

### Zásady pro vypracování:

V rámci bakalářské práce bude vypracována literární rešerše se zaměřením na metody a způsoby mikronizace léčiv, zejména v oblasti metod srážecích a s využitím superkritické fluidní extrakce. Bude rovněž studován vliv velikosti částic na biodostupnost léčiv a metody hodnocení biodostupnosti léčiv. Získané poznatky budou aplikovány na některé z uvedených léčiv: hydrochlorothiazid, rhisedronát a cimetidin. Připravené submikronové částice budou porovnány s částicemi získanými tryskovým mletím. Pro charakterizaci budou použity metody SEM, XRD, FTIR, PSD a budou provedeny testy rozpustnosti.

### Seznam doporučené odborné literatury:

M. Perrut, J. Jung, F. Leboeuf. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by Supercritical Fluid processes. Part I: Micronization of neat particles. International Journal of Pharmaceutics, 288 (2005) 3-10.

T.K. Fahim, I.S.M. Zaidul, M.R. Abu Bakar, U.M. Salim, M.B. Awang, F. Sahena, K.C.A. Jalal, K.M. Sharif, M.H. Sohrab. Particle formation and micronization using non-conventional techniques- review. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 86 (2014) 47-52.

X. Han, Ch. Ghoroi, D. To, Y. Chen, R. Davé. Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles. International Journal of Pharmaceutics, 415, 1-2, (2011) 185-195.

A. Pobudkowska, U. Domańska, B.A. Jurkowska, K. Dymczuk. Solubility of pharmaceuticals in water and alcohols. Fluid Phase Equilibria, 392, (2015) 56-64.


F. Hampl, S. Rádl, J. Paleček. Farmakochemie. VŠCHT Praha, 2015.

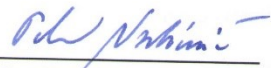
Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**

Datum zadání: 20. 10. 2015

Datum odevzdání: 16. 05. 2016

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.  
vedoucí katedry

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Petr Noskiewicz, CSc.  
prorektor pro studium



**Místopřísežné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem celou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě 16. 5. 2016

Podpis studenta:

Lukášová Teréna

**Prohlašuji, že**

- jsem celou bakalářskou práci, včetně příloh, vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu,
- byl jsem seznámen s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a §60 – školní dílo,
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§35 odst. 3),
- souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB-TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé bakalářské práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO,
- bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona,
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše),
- beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě : 16.5. 2016

Lukášová Tereza

podpis studenta

Jméno studenta: Tereza Lukášová

Adresa trvalého pobytu autora práce: Ztracená 1655, Rychvald 735 32

## **Poděkování:**

Tato bakalářská práce vznikla za podpory projektu SP 2016/85 Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritické tekutiny II. a za podpory projektu LO1404: Trvale udržitelný rozvoje centra ENET.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Kupkové Ph.D. za provedení analýz na rentgenovém difraktometru, Mgr. Kristině Čabanové za práci na FTIR a Bc. Tomáši Sosnovi za zaškolení na přístroji pro superkritickou fluidní extrakci, a dále Ing. Karle Čech Barabaszové, Ph.D. za provedení analýz distribuce velikosti částic, Mgr. Kateřině Dědkové, Ph.D. za provedení analýz na skenovacím elektronovém mikroskopu a Ing. Soně Študentové za změření specifického povrchu částic.

Především bych chtěla poděkovat paní doc. Ing. Daniele Plaché, Ph.D. a Mgr. Ivetě Martausové, Ph.D. za poskytnutí konzultací, za odborné rady a vedení při mé bakalářské práci.

## Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na přípravu submikronových částic a nanočástic cimetidinu. K přípravě bylo použito kulové a tryskové mletí a zároveň superkritická fluidní extrakce. Mikronizace částic pomocí superkritické fluidní extrakce byla provedena metodou GAS. Částice cimetidinu byly připraveny při různé teplotě, tlaku a délce statické fáze. Výsledky mikronizace pomocí kulového mletí, tryskového mletí a superkritické fluidní extrakce byly charakterizovány skenovací elektronovou mikroskopií, infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací a rentgenovou difrakční analýzou. Byla analyzovaná velikost a distribuce velikosti původních a mletých částic. Výsledky analýz byly v závěru práce porovnány.

Lukášová, Tereza. *Příprava submikronových částic a nanočástic vybraných léčiv*. Ostrava, 2016. Bakalářská práce. VŠB – Technická univerzita Ostrava. Univerzitní studijní programy, s. 64.

## Annotation

Bachelor thesis is focused on preparation of submicron particles and nanoparticles of cimetidine. For the preparation three methods were used – ball milling, jet milling, supercritical fluid extraction. Supercritical fluid extraction was performed in the GAS mode. Particles were prepared under different condition – temperature, pressure, time. All the prepared samples were characterized with scanning electron microscopy, infrared spectroscopy with Fourier transform, x-ray diffraction and particle size distribution. In the conclusion there will be comparison of obtained results.

Lukášová, Tereza. *Preparation of submicron particles and nanoparticles of selected pharmaceuticals*. Ostrava, 2016. Bachelor thesis. VŠB – Technical University Ostrava. University study programs, p. 64.

# OBSAH:

1. Úvod.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
2.1 Léčiva.....	13
2.1.1 Klasifikace léčiv .....	13
2.1.2 Biodostupnost.....	14
2.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv a jejich transport .....	15
2.1.4 Vliv velikosti částic na biodostupnost.....	18
2.1.5 Metody hodnocení biodostupnosti .....	19
2.1.6 Cimetidin $C_{10}H_{16}N_6S$ .....	20
2.2 Metody mikronizace léčiv – mlecí techniky.....	22
2.2.1 Mikronizace léčiv v suchém stavu .....	23
<i>Spirální tryskový mlýn .....</i>	<i>23</i>
<i>Fluidní tryskový mlýn.....</i>	<i>24</i>
<i>Planetární kulový mlýn .....</i>	<i>24</i>
2.2.2 Mokrý mikronizace .....	25
2.2.3 Kryogenní mletí .....	26
2.2.4 Vybrané metody pro zvýšení efektivity mletí .....	27
<i>In situ mikronizace .....</i>	<i>27</i>
<i>Tryskové mletí s povrchovou úpravou .....</i>	<i>28</i>



2.3	Metody mikronizace – srážecí techniky .....	28
2.4	Metody mikronizace - superkritická fluidní extrakce .....	31
2.4.1	Superkritické kapaliny .....	31
2.4.2	Rychlá expanze superkritické směsi a její modifikace (RESS) .....	33
2.4.3	Metoda anti-rozpouštědla v plynném stavu (GAS).....	34
2.4.4	Metoda superkritického anti-rozpouštědla (SAS).....	35
2.4.5	Metoda extrakčního systému s rozpouštědlem ve stavu aerosolu (ASES) .....	36
2.4.6	Metoda roztoku dispergovaného superkritickou kapalinou (SEDS).....	36
<b>3.</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
3.1	Použité chemikálie a přístroje .....	37
3.2	Procesy mikronizace léčiva .....	38
3.2.1	Mletí planetárním mlýnem .....	38
3.2.2	Mletí tryskovým mlýnem .....	38
3.2.3	Superkritická fluidní extrakce .....	39
3.3	Metody charakterizace .....	41
<b>4.</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>42</b>
4.1	SEM - skenovací elektronová mikroskopie .....	43
4.2	FTIR - infračervená spektroskopie .....	46
4.3	XRD - rentgenová difrakční analýza .....	49
4.4	PSD – analýza velikosti částic .....	53
4.5	Srovnání specifického povrchu s distribucí velikosti částic .....	55

4.6	Testy rozpustnosti .....	57
4.7	Diskuze .....	57
<b>5.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>60</b>

## Seznam použitého označení a zkratk

ARISE – metoda atomizace rychlým vstřikováním určená pro extrakci rozpouštědlem

ASES – metoda, využívající extrakčního systému s rozpouštědlem ve stavu aerosolu

AUC – plocha pod koncentrační křivkou

BCS – Biofarmaceutický klasifikační systém

BET – Brunaer-Emmett-Teller

CIM – cimetidin

CNT – Centrum nanotechnologií

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GAS – metoda využívající superkritické kapaliny jako anti-rozpouštědla v plynném stavu

IT4INNOVATION – Národní superpočítačové centrum

PAMPA – test biodostupnosti přes umělou membránu

PCA – metoda využívající superkritického stlačeného anti-rozpouštědla

PSD – distribuce velikosti částic

SAS – metoda využívající superkritického anti-rozpouštědla

SEDS – metoda roztoku dispergovaného superkritickou kapalinou

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

RESS – metoda rychlé expanze superkritické směsi

RESSAS – rychlá expanze superkritické směsi do vodného roztoku

RESS-N – metoda rychlé expanze superkritické směsi s anti-rozpouštědlem

RESSOLV – metoda rychlé expanze superkritické směsi do kapalného rozpouštědla

RMTVC – Regionální materiálové technologické výzkumné centrum

VŠB – TUO – Vysoká škola báňská Technická univerzita Ostrava

XRD – rentgenová difrakční analýza

# 1. Úvod

Tato práce je zaměřena na přípravu submikronových částic a nanočástic vybraných léčiv, konkrétně byl vybrán cimetidin. Cimetidin se v České republice již jako léčivo nepoužívá, ovšem jeho potenciál opět narůstá. Výsledky posledních výzkumů ukázaly, že by se mohlo jednat o slibné léčivo při léčbě rakoviny.

Velké množství farmaceuticky vyvinutých léčiv je prakticky nerozpustných ve vodě. Což je velkým problémem biodostupnosti. Zvýšení rozpustnosti léčiva se dá dosáhnout pomocí redukce velikosti částic, kdy dochází ke zvětšení specifického povrchu a tím ke zlepšení rozpustnosti.

Hlavním cílem teoretické části této práce bylo vypracování literární rešerše zaměřené na možné způsoby mikronizace léčiva. Zejména pak na superkritickou fluidní extrakci. Dále také byla zpracována literární rešerše o léčivech a jejich vlastnostech a o biodostupnosti léčiv. Cílem praktické části byla mikronizace částic cimetidinu pomocí kulového a tryskového mletí a metodou superkritické fluidní extrakce. Hlavním cílem bylo optimalizovat podmínky superkritické fluidní extrakce při přípravě velikostních frakcí cimetidinu a porovnání výsledků s ostatními provedenými metodami mikronizace.

Superkritická fluidní extrakce je provedena pomocí přístroje Speed SFE-4. Pro přípravu byla vybrána metoda GAS z důvodu polarity cimetidinu, což má za následek nerozpustnost v oxidu uhličitém. Připravené velikostní frakce byly následně charakterizovány elektronovou mikroskopií, infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací, rentgenovou difrakční analýzou a distribucí velikosti částic. V poslední části práce je diskuze dosažených výsledků a závěr.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Léčiva

Léčiva jsou definována Zákonem o léčivech (č. 378/2007 Sb.) jako léčivé látky, směs léčivých látek nebo léčivé přípravky [1]. Léčivé přípravky jsou vytvořeny technologicky z léčivých látek a z látek pomocných. Léčivé látky jsou někdy nazývány látkami aktivními a právě ty způsobují účinek léčivého přípravku. Oproti tomu pomocná látka je látka, která pouze usnadňuje výrobu léčivého přípravku či ovlivňuje farmakokinetické vlastnosti aktivní látky. Nemá žádný vlastní účinek. Pomocné látky mohou být technické (např. organická rozpouštědla) či farmaceutické (např. voda). Ve výsledném produktu nalezneme pouze látky farmaceutické, technické látky se zde nenacházejí. Je důležité, aby léčivá látka reagovala po vstupu do organismu. Léčivé přípravky jsou nakonec zpracovávány do určité lékové formy (kapky, tablety, injekce aj.). Konečným výsledkem je pak lék, který je užíván pacientem. Vývoj nových léčivých přípravků nese řadu problémů, které jsou spojeny s jednotlivými molekulami. Důležité je konstruovat molekuly tak, aby se optimalizovali jejich biologické vlastnosti [2-5]. Dezinfekční, dezinsekční, laboratorní diagnostické ani kosmetické přípravky nejsou považovány za léčiva a ani nesmějí obsahovat označení léčebné indikace [5].

#### 2.1.1 Klasifikace léčiv

Pro tuto práci je podstatné rozdělení léčiv z hlediska rozpustnosti ve vodném prostředí a permeability střevní stěnou. Toto rozdělení je dáno biofarmaceutickým klasifikačním systémem (BCS), který dělí léčiva do čtyř základních tříd, jak ukazuje Tabulka I [6].

Tabulka I: Biofarmaceutický klasifikační systém léčiv

třída	permeabilita	rozpustnost
I.	vysoká	vysoká
II.	vysoká	nízká
III.	nízká	vysoká
IV.	nízká	nízká

Lék je považován za vysoce rozpustný, když jeho maximální dávka je rozpustná v 250 ml vody o pH 1-6,8. Za vysoce permeabilní je lék považován, když více než 85 % léku projde přes střevní stěnu. U léků se také dále hodnotí rychlost rozpadu lékové formy, lék se považuje za rychle uvolněný, když se 85 % lékové formy uvolní do 30 minut. Za velmi rychle uvolněný lék je považován ten, který je z 85 % uvolněn do 15 minut [6].

### **2.1.2 Biodostupnost**

Biodostupnost je vlastností farmakokinetiky, která patří společně s farmakodynamikou, do oboru zabývajícího se studiem účinku léčiv, interakcí léčiv s organismy, do takzvané farmakologie. Farmakodynamika se zabývá působením léčiva na daný organismus, kdežto farmakokinetika se zabývá působením organismu na léčivo. V organismu dochází ke třem významným interakcím léčivo-organismus. V první fázi je léčivo přijato organismem a dochází k uvolňování léčivé látky z lékové formy, tato fáze je nazývaná fází farmaceutickou. Následující je fáze farmakokinetická, kdy organismus začíná reagovat na přijaté léčivo. Farmakodynamická je fáze poslední, při které dochází k reakci léčiva s receptorem [3, 7, 8].

Jedním z hlavních problémů při výrobě léčiv je právě jejich biodostupnost. Biodostupností je označován vstup určité dávky léčiva do oběhového systému organismu a jeho účinné využití. Důležité je, aby nedošlo ke změně léčivých účinků daného léčiva. Biologická dostupnost je ovlivněna hlavně vstřebatelností (absorpcí), degradací látky ještě před vstřebáváním, lékovou formou a dalšími [9]. Problémem je, že stále roste počet nových účinných látek, které vykazují velmi malou biodostupnost. Farmaceutický průmysl se snaží vyvinout metody k vytvoření těchto látek s vhodnou biodostupností, tj. účinností [10].

Bylo prokázáno, že ve většině perorálně podávaných léčiv, je rychlost absorpčního procesu omezena rozpouštěním v gastrointestinální tekutině. V případě parenterálního podání (tj. jiná než perorální aplikace nebo aplikace přímo do krevního řečiště) je biodostupnost také limitována problémy s rozpustností (riziko vzniku sraženin v bodě aplikace, pomalé rozpouštění v krevním séru a další). Proto léky s nízkou rozpustností mají tendenci být odstraněny z gastrointestinálního traktu dříve, než se zcela rozpustí a následně se absorbují do

krvního oběhu. Rychlost rozpouštění léčiva a střevní propustnost jsou tudíž klíčové pro biologickou dostupnost [10].

Více než 40 % léčiv vyvinutých ve farmaceutickém průmyslu je prakticky nerozpustných ve vodě. Tyto látky mají pomalou absorpci, která vede k nedostatečné a proměnlivé biologické dostupnosti a k toxickému účinku na gastrointestinální trakt [11].

Chceme-li optimalizovat biologickou dostupnost léčivých látek, je nutné pečlivě vybírat nejvhodnější chemickou strukturu léčiva. Volba by se měla zabývat požadavky na rozpustnost léčiva a velikost částic léčiva [11]. Ke zlepšení biodostupnosti špatně rozpustných léčiv bylo vyvinuto mnoho přístupů. Fyzikální úpravy vedou ke zvýšení povrchové plochy, rozpustnosti, smáčivosti částic léčiva nebo vývoji amorfních stavů. Nejběžnější metodou ke zvýšení povrchu léčiv je mikronizace. K redukci velikosti částic léčiva lze využít mletí například v kulovém nebo tryskovém mlýně, případně použití superkritických tekutin, na které je tato práce zaměřena [12].

### **2.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv a jejich transport**

Poté, co se léčivo dostane do organismu, následuje jeho transport k cílové struktuře. Transport je zajišťován krevním oběhem. Lidský organismus je ze 70 % tvořen vodou, která se v lidském organismu nachází nejen v tělních tekutinách, ale i v tkáních. Proto je důležité, aby léčivo bylo dobře rozpustné ve vodě. Kromě rozpustnosti je podstatná i rychlost rozpouštění léčiva. Pokud není zajištěná dobrá rozpustnost, je nutné, aby se léčivé látky byly schopny vázat na bílkoviny krevní plazmy. Předpokládáme-li vysokou rozpustnost léčiva, dojde k rychlému vstřebávání, ovšem i k rychlému vylučování léčiva z organismu. To lze považovat za nevýhodu, protože dojde pouze ke krátkodobému účinku. Pokud naopak je rozpustnost léčiva ve vodě snížena, může dojít až k úplnému zániku léčivého účinku [3, 8, 13].

Léčivé látky se dostávají k cílovým strukturám především difuzí. Důležité je, aby se tyto látky dostaly přes biologické membrány, které jsou tvořeny dvojvrstvou glycerofosfolipidů. To v případě difuze vždy možné. Difuze je pasivním transportem, kdy je zajištěn prostup léčivých látek přes biologické membrány [3,8,13]. Princip difuze je založen na prostupu látek z prostředí

o koncentraci vyšší do prostředí o koncentraci nižší, přičemž není třeba dodat další energii. Difuze je popsána Fickovými zákony. První Fickův zákon [14]:

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.1)$$

kde  $J$  je hustota toku,  $D$  je difuzní koeficient a  $\frac{\partial c}{\partial x}$  koncentrační gradient. Tento zákon vyjadřuje, že množství látky, které projde za jednotku času plochou je přímo úměrné zápornému spádu koncentrace [14].

Druhý Fickův zákon zohledňuje závislost na čase. V prostorovém rozměru je tedy difuze popsána [13 - 15]:

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

kde  $\frac{\partial c}{\partial \tau}$  je koncentrační gradient v závislosti na čase,  $\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$  křivost koncentračního profilu v daném místě  $x$ . Prostup přes biologické membrány pomocí difuze záleží především na lipofilitě látek [13 - 15].

Lipofilita je vlastností látek, která udává jejich míru rozpustnosti v tucích, kdy dochází k interakci s biomakromolekulami a při které se uplatňují síly hydrofobní či polární interakce. Aby látka snadno procházela přes membránu, měla by mít lipofilnější charakter. Rozpustnost ve vodě či rozpustnost v lipidech jsou na sobě nepřímo závislé. Pokud je rozpustnost v tucích vyšší, projeví se to nižší rozpustností ve vodě. Pokud je rozpustnost ve vodě vyšší, pak se to projeví nižší rozpustností léčiva v tucích. Tuto lipo-hydrofilní vlastnost lze vyjádřit pomocí takzvaného rozdělovacího koeficientu  $P$  [12, 15]:

$$P = \frac{c_L}{c_V} \quad (2.3)$$

kde rozdělovací koeficient  $P$  udává poměr celkových koncentrací léčivé látky, jak v lipidech ( $c_L$ ), tak ve vodě ( $c_V$ ) [13]. Lipo-hydrofilní vlastnost, jak již bylo výše zmíněno, souvisí s prostupem léčivé látky přes biologické membrány pomocí difuze. V závěru lze tedy očekávat podle závislosti difuze na rozdělovacím koeficientu, že léčiva, která budou mít rozdělovací koeficient vyšší, budou rychleji difundovat; u léčiv s rozdělovacím koeficientem nižším by se dala předpokládat difuze mnohem pomalejší [13, 15].



Pro samotný transport léčivé látky na dané místo účinku a lepší využitelnost látek, je někdy potřeba zvýšit rozpustnost léčivé látky ve vodě. Zvýšení rozpustnosti je umožněno modifikací struktury či solubilizačním účinkem. Někdy je zapotřebí naopak rozpustnost léčivé látky ve vodě snížit, za účelem pomalejšího vstřebávání. Toho lze dosáhnout chemickou obměnou či přípravou špatně rozpustných solí [13].

Velmi významnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiv jsou i kyselost a zásaditost. Tyto vlastnosti úzce souvisí s ionizací léčivých látek v různých orgánech. Stupeň ionizace ( $pK_a$ ) je vyjádřen záporným dekadickým logaritmem kyselé disociační konstanty. Pokud je disociační konstanta u kyseliny nižší, pak kyselina lépe ionizuje a je silnější. Oproti tomu pokud disociační konstanta u báze vyšší, pak lépe ionizuje a je silnější báze. U léčiv dosahují disociační konstanty hodnot okolo 2,0-10,8. Stupeň ionizace je závislý kromě disociační konstanty i na pH prostředí. Ke zjištění stupně ionizace se používá Hendersonova-Hasselbalchova rovnice. Pro kyseliny rovnice (2.4) a pro zásady rovnice (2.5) [3, 13]:

$$pK_a = pH + \log \frac{c_n}{c_d} \quad (2.4)$$

$$pK_a = pH + \log \frac{c_d}{c_n} \quad (2.5)$$

kde  $pK_a$  je disociační konstanta,  $pH$  je pH prostředí,  $c_n$  je molární koncentrace nedisociované látky a  $c_d$  je molární koncentrace disociované látky. Pokud je disociační konstanta rovna pH prostředí, je látka z 50 % disociovaná. Difuze léčivé látky přes membrány probíhá pouze v její neionizované formě (rozpuštěné v tucích). Nerozpustná v tucích je pak forma ionizovaná. Dojde-li k tomu, že pH bude rozdílné na obou stranách biologické membrány, bude i ionizace rozdílná. Ovšem koncentrace neionizované látky se na obou stranách biologické membrány musí nacházet v rovnovážném stavu. Lze tudíž usoudit, že celková koncentrace bude vyšší na straně ionizace, proto se kyselá léčiva hromadí na straně zásadité a zásaditá léčiva na straně kyselé [3, 13].

Pasivní transport léčiv, je nejčastějším transportem přes glycerofosfolipidovou membránu a lze usoudit, že je závislý na rozpustnosti léčiva, jeho lipofilitě a taktéž na bazicitě a aciditě [3, 13]. Pro úplnost je třeba doplnit, že kromě pasivního transportu může probíhat i transport aktivní. Aktivní transport potřebuje určitou energii, aby mohl být uskutečněn, probíhá proti koncentračnímu spádu. Energie potřebná k transportu je dodána díky štěpení nukleotidu

adenosintrifosfátu. Tento prostup je ovšem méně častý a je umožněn díky iontovým kanálkům nebo glykoproteinům. Při transportu pomocí proteinů je důležité, aby léčivá látka byla schopna vytvořit komplex s příslušnou bílkovinou [3, 7, 8, 13].

#### **2.1.4 Vliv velikosti částic na biodostupnost**

Zlepšení rozpustnosti léčiva, a tím i usnadnění jeho transportu k cíli (biologická dostupnost), je nejnáročnější fáze při procesu vývoje nových léčiv. V literatuře je mnoho přístupů pro zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných léčiv ve vodě. Tyto techniky jsou vybírány na základě různých kritérií, jako jsou vlastnosti léku, druh pomocných látek, povaha lékové formy a další [11].

Snížení velikosti částic vede ke zvýšení specifického povrchu léčiva (tj. povrchové plochy na jednotku objemu). Čím menší je částice, tím větší je plocha povrchu, což umožňuje zvýšení poměru povrchové plochy k objemu. Rychlost rozpouštění, rychlost absorpce, léková forma jsou závislé i na velikosti částic léčiva. Jemný materiál, často v jednotkách submikrometrů a nanometrů, s velkým specifickým povrchem se rozpouští rychleji. To vede ke zlepšení absorpce léčiva pasivní difuzí [16].

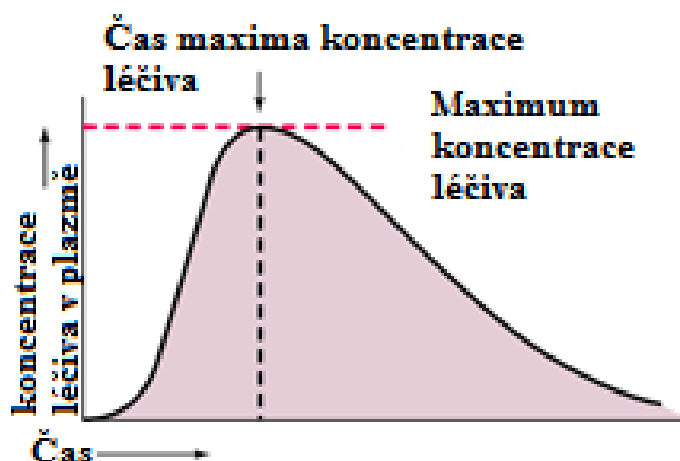
Míra rozpouštění léčiva je přímo úměrná ploše léčiva, s klesající velikostí částic se zvyšuje rozpustnost. Studie s řadou špatně rozpustných léčiv prokázaly, že snížení velikosti částic může vést ke zvýšení rychlosti rozpouštění a vyšší biologické dostupnosti. Většina těchto studií zahrnuje mechanické snížení velikosti částic na hodnoty okolo 1  $\mu\text{m}$ . Například mikronizace částic griseofulvinu na velikost okolo 3-5  $\mu\text{m}$  se ukázala velmi úspěšnou pro zvýšení rychlosti rozpouštění tohoto léčiva. Míra rozpouštění má vliv i na absorpci léčiva [16, 17].

Čím menší je velikost částic, tím větší je specifická plocha léčiva. Větší je i míra rozpouštění [18]. Rozpustnost významně roste při snížení velikosti částic pod 1  $\mu\text{m}$ . To vyplývá z toho, že zmenšením částic pod 1  $\mu\text{m}$  se zvyšuje tlak solvatace, což vede ke zvýšení rozpustnosti [19]. Specifická plocha povrchu závisí na schopnosti gastrointestinální tekutiny smáčet povrch částice. Pokud rozpouštěcí medium má špatné smáčecí vlastnosti, mikronizace

má za následek pokles míry rozpouštění v důsledku aglomerace. To bylo prokázáno v případě fenobarbitalu. Zmenšení velikosti částic je tak bezpečným způsobem, jak zvýšit rozpustnost léčiv, aniž by došlo k chemické změně léčivé látky [17].

### 2.1.5 Metody hodnocení biodostupnosti

Biodostupnost je vyhodnocována měřením koncentrace léčiva v krevní plazmě v závislosti na čase. Většina měření biologické dostupnosti léčiva je vyhodnocována z hodnot AUC (area under the curve). Hodnota AUC je přímo úměrná celkovému množství nezměněného léčiva, které se dostane do oběhu [20, 21].



Obrázek 1: Závislost koncentrace léčiva v plazmě na čase [17].

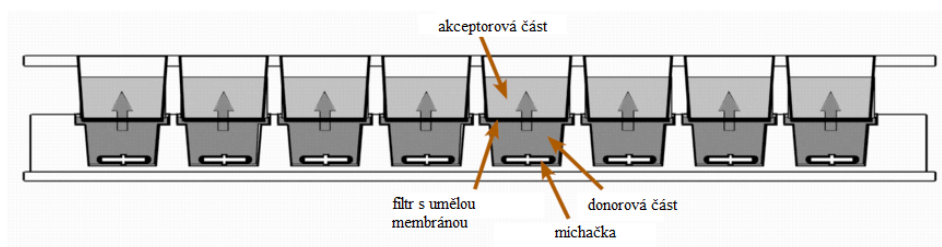
Koncentrace léčiva v krevní plazmě roste s mírou absorpce. Maximum koncentrace léčiva stanovuje nejvyšší bod křivky (Obrázek 1). Stanovení biodostupnosti podle maximální koncentrace léčiva v plazmě je zavádějící, poněvadž eliminace léčiva začíná, jakmile se léčivo dostane do krevního řečiště. Obecně je absorpce hodnocena dobou dosažení maxima, čím je doba delší, tím pomalejší je absorpce [20].

Při analýze léčiv a jejich měření se předpokládá, že koncentrace podaného léčiva v krvi je stejná jako koncentrace léčiva v daném místě účinku. Tudíž je absorpce (vstřebávání) prakticky definována jako proces, kdy se nezměněné léčivo z místa podání dostane k cílovému místu. Vliv na absorpci mají především míra rozpouštění léčiva, rozpustnost a propustnost [21].

Rozpustnost léčiva je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech. Na druhou stranu, složení léčiva má na míru rozpouštění velký vliv. Proto je do léčiv přidáván excipient či inertní látka, které napomáhají optimální absorpci. Spousta běžně využívaných inertních látek ale neovlivňuje absorpci přímo, zlepšuje ji působením na speciální transportní látky trávicího ústrojí [21].

Jednou z hlavních metod hodnocení biodostupnosti jsou PAMPA testy (Parallel artificial membrane permeability assay). PAMPA testy dokáží rychle poskytnout informace o pasivní transportní propustnosti, která není ovlivněna jinými mechanismy, jakými jsou paracelulární transport, aktivní transport nebo metabolismus. V poslední době se intenzivně využívají ve farmaceutickém výzkumu, protože se jedná o snadnou, levnou alternativu k ostatním hodnotícím metodám [22].

PAMPA je *in vitro* modelem pasivní, transbuněčné propustnosti. Jedná se o umělou membránu umístěnou na filtru. Filtr se nachází mezi donorovou a akceptorovou částí systému. Na začátku testu je léčivo umístěno do donorové části. Poté dochází k pronikání léčiva do části akceptorové (Obrázek 2). Po celou dobu je měřena koncentrace léčiva v obou částech systému pomocí kapalinové chromatografie [23].

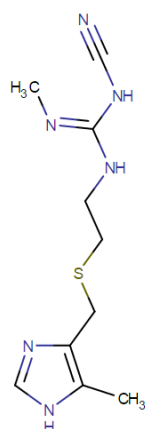


Obrázek 2: *Pampa test* [23].

### 2.1.6 Cimetidin $C_{10}H_{16}N_6S$

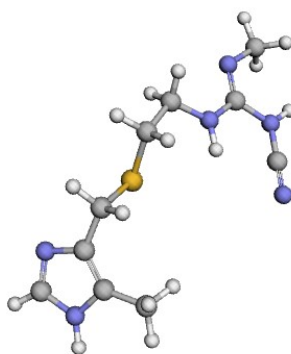
Pro tuto práci byl z léčiv vybrán cimetidin, který bude používán k přípravě submikronových částic a nanočástic v praktické části. Výběr tohoto léčiva byl ovlivněn tím, že použití cimetidinu má velký potenciál. Výsledky posledních výzkumů ukázaly, že by se mohlo jednat o slibné léčivo při léčbě rakoviny [25].

Cimetidin je bílá krystalická látka, která je dobře rozpustná v 96% ethanolu, rovněž dobře rozpustná ve zředěných minerálních kyselinách, methanolu, těžce rozpustná ve vodě a nerozpustná v dichlormethanu, oxidu uhličitým a etheru. Měrná hmotnost cimetidinu je 1,3 g/cm<sup>3</sup>, teplota tání 141 °C a bod varu je 488 °C při atmosférickém tlaku vzduchu. Cimetidin je zařazen do III. třídy biofarmaceutického klasifikačního systému - nízká permeabilita a vysoká rozpustnost [26, 27].



21

Tato látka je polymorfní, což znamená, že krystalizuje ve více krystalických modifikacích. Polymorfismus má vliv na chemickou stabilitu. Kromě toho krystalová struktura ovlivňuje rozpustnost léčiva a jeho účinnost. Termodynamicky stabilnější polymorfy jsou více chemicky stabilnější než metastabilní polymorfy. Protože polymorfy mají různé mřížkové energie, mají méně stabilní polymorfy s větší energií tendenci transformovat se na stabilnější polymorfy. Stabilnější polymorfy mají menší energii a pravděpodobně mají menší rozpustnost. K transformaci může dojít již při výrobě, ale může k ní dojít i během skladování. Různé krystalické modifikace se vyznačují odlišnou teplotou tání a zejména pak rozpustností či rychlostí rozpouštění. U cimetidinu existují 4 základní polymorfy A, B, C, D. V rámci jednotlivých polymorfů existuje mnoho izomerů. Kromě nich existuje i amorfní forma a monohydrát. Dehydratací monohydrátu lze získat směs polymorfů A, B, C nebo čistý polymorf. Polymorf A má podobu destiček. Polymorf B má jehličkovitý tvar. Polymorf C je tvořen krátkými jehličkami. Polymorf D vytváří hranolové krystaly. [4, 26, 28].



Obrázek 4: 3D struktura cimetidinu [27].

## 2.2 Metody mikronizace léčiv – mlecí techniky

Mikronizace je termín, který je používán k popisu redukce velikosti částic, kdy výsledná velikost nově vzniklých částic je menší než 10  $\mu\text{m}$ . Tento proces je historicky nejpoužívanější metodou, která slouží ke zvýšení biodostupnosti. Mikronizace je fyzikální úpravou částic, u které se předpokládá zlepšení rozpustnosti. Mikronizace velikosti částic využívá principu, kdy dochází k mletí v důsledku srážek jednotlivých částic mezi sebou nebo v důsledku srážky

částic s pevným povrchem. K mikronizaci lze použít mlecí mlýny, srážecí reakce či superkritickou fluidní extrakci [29, 30].

Mlecí techniky se používají pro tuhé částice za účelem jejich zmenšení pomocí mechanického dělení. Tento proces je poměrně náročný, co se týče spotřeby energie. Existuje několik typů mletí. Pokud je materiál suspendovaný ve vodě, jedná se o mletí mokré. Suché mletí je mletí materiálu v suchém stavu a kryogenní mletí je mletí materiálu za přítomnosti kapalného dusíku [4].

### **2.2.1 Mikronizace léčiv v suchém stavu**

#### ***Spirální tryskový mlýn***

Tento mlýn je vhodný pro jemné a ultra jemné mletí materiálů s tvrdostí 3 Mohsovy stupnice. Má jednoduchou konstrukci, která je tvořena plochou válcovitou mlecí komorou s několika tryskami, pneumatickým přívodním injektorem a přívodní nálevkou. Zdrojový materiál je urychlován do mlecí komory skrz přívodní injektor. Uvnitř mlecí komory je materiál vystaven dvěma silám – odstředivé síle a tažné síle. Tažná síla je tvořena vírem uvnitř komory, kdy dochází ke střetu drah částic materiálu s částicemi tlakového média. Částice se vlivem tažné síly omílají. Odstředivá síla způsobuje tlak větších částic na stěny komory. Po stěně komory částice obíhají tak dlouho, než dojde k jejich mikronizaci [30, 31].

Spirální tryskový mlýn je velmi efektivním nástrojem k mikronizaci částic. Využívá se především ve farmaceutickém průmyslu, ovšem jeho použití má několik limitujících podmínek. Jednou z nich je velikost částic zdrojového materiálu, ta je závislá na velikosti přívodního injektoru. Větší částice by mohly způsobit ucpání injektoru, to by vedlo k nerovnoměrnému vstupu částic, což by se projevilo na změně distribuce velikosti částic. Tomu lze předejít upravením zdrojového materiálu a použitím vibrací k případnému odstranění blokády. Při mikronizaci může také docházet k hromadění částic na stěně komory, to je problém zejména při mikronizaci lepkavých látek, například steroidů. Největším problémem je nemožnost kontrolovat distribuci velikosti částic. Tyto limitující podmínky vedly k vývoji fluidního protiproudého tryskového mlýnu [30].

### ***Fluidní tryskový mlýn***

Fluidní tryskový mlýn účinně snižuje velikost částic léčiva z 20-100  $\mu\text{m}$  na méně než 10  $\mu\text{m}$ . Při tomto způsobu mikronizace je stlačený vzduch vstřikován do komory, kde dochází ke kontaktu se zdrojovým materiálem, ten se do komory dostává přes injektor. Výhodou injektoru je možnost měnit rychlost vstupu zdrojového materiálu, což u spirálového tryskového mlýna nebylo možné. Částice jsou stlačeným vzduchem urychlovány a dochází ke vzájemným vysokorychlostním srážkám mezi částicemi a zároveň ke srážkám se stěnami komory. Redukce velikostí částic je způsobena nárazy a otěrem. Redukce velikosti otěrem nastává vlivem třecích sil působících na částice, které se pohybují proti sobě vysokou rychlostí. Do mlecí komory může být zapojen třídič, který z mlecí komory odvádí částice, které již dosáhly požadované velikosti [30, 32].

Tento způsob mikronizace je vhodný pro léčiva, která jsou teplotně nestabilní. Léčiva mohou být mletá samostatně nebo za přítomnosti vhodného excipientu. Například u fenofibrátu, který je špatně rozpustný ve vodě, bylo zjištěno, že pokud je provedena mikronizace spolu s hydrofilním excipientem, dojde k urychlení doby rozpouštění léčiva. Což je velmi výhodné oproti tomu, kdy je fenofibrát smíchán s excipientem až po mikronizaci [32].

Popularita fluidního tryskového mlýnu klesla s vývojem nových mlecích technik, které umožňují nastavit větší rozsah velikosti připravených částic. Pak je možno připravit submikronové částice nebo nanočástice léčiv v komerčním měřítku. Nejnížší průměry částic dosažené fluidním mletím byly 3-5  $\mu\text{m}$  s distribucí velikosti v rozmezí od několika stovek nanometrů po 25  $\mu\text{m}$ . Za účelem zvýšení rozpustnosti léčiva lze fluidní tryskový mlýn použít v kombinaci s dalšími technikami (bottom up, srážení, krystalizace) k výrobě částic léků s požadovanou morfologickou stavbou [32].

### ***Planetární kulový mlýn***

Pro výrobu mikročástic především v laboratořích se často využívá planetárního kulového mlýnu. Tento mlýn se skládá z kulovité či válcovité komory, která obsahuje mlecí koule. Mlecí koule jsou vyrobeny z inertních materiálů, například keramiky, achátu, nitridu křemíku, slinutého korundu, oxidu zirkoničitého nebo chromové oceli. Komora se otáčí kolem své



horizontální osy. Pohyb komory způsobuje pohyb mlecích koulí, srážení jednotlivých mlecích koulí mezi sebou a s vnitřní stěnou komory. Zdrojový materiál se vkládá do kulovité komory, která je schopna rotace a vibrace o určité rychlosti a frekvenci. Redukce velikosti částic je zapříčiněna srážkami s mlecími koulemi a silami vznikajícími při pohybu koulí. Intenzita mlecího procesu je ovlivněna počtem mlecích koulí a množstvím zdrojového materiálu. Obvykle je mlecí komora naplněna koulemi z 50 % a zdrojovým materiálem z 25 % celkového objemu mlecí komory. Rotace komory se provádí při 50 – 80 % kritické rychlosti. Kritická rychlost je definována jako rychlost, při které se mlecí koule již nepohybují vlivem odstředivé síly. Na výsledný rozsah velikosti částic má vliv rychlost rotace komory a vlastnosti mlecích koulí (hustota, tvrdost, velikost) [19, 31, 32].

Technika mikronizace částic pomocí planetárního kulového mlýna je rovněž podstatná pro přípravu amorfních prášků léčiv. Pokud je k léčivu přidán vhodný excipient, dochází v kulovém mlýně nejen k mikronizaci, ale i k intenzivnímu promísení léčiva s excipientem. Vzniklá směs obsahuje amorfni formu léčiva smíchanou s vhodným hydrofilním excipientem na molekulární úrovni. Příprava amorfni formy vede ke zlepšení vlastnosti léčiv. Amorfni forma léčiva je snadněji rozpustná než forma krystalická z důvodu vyšší Gibsovy energie. Přestože je účinnost mletí za účelem zmenšení velikosti částic a amorfizace dobrá, není mletí v planetárním kulovém mlýně možné využít při průmyslové přípravě velkého množství částic v důsledku zahřívání [4, 19, 32].

### **2.2.2 Mokrý mikronizace**

Výše uvedené mlýny, fluidní tryskový mlýn a kulový mlýn, umožňují redukci částic léčiva v suchém stavu. Rozsah velikosti částic získaných v suchých podmínkách je limitován na několik mikrometrů. Pokud je rozpustnost léčiva velmi nízká, ke zvýšení rozpustnosti a gastrointestinálnímu vstřebávání je zmenšování na mikrometry nedostatečné [32, 33].

V posledním desetiletí došlo k významným pokrokům a vývoji mlecích technik, které umožnily přípravu submikronových částic (pod 1  $\mu\text{m}$ ) nebo nanočástic. Tento proces je označován jako nanonizace, Nanočástice o velikostech 200-500 nm jsou vhodné pro přípravu parenterálních přípravků. Velkou výhodou nanočástic oproti mikročásticím je zvýšení

rozpuštěnosti léčiva. Proces nanonizace zvyšuje nejen povrchovou plochu a rozpustnost léčiva, ale i míru nasycenosti roztoku. Vzhledem tomu, že můžeme získat koncentrovanější roztok léčiva, se zlepšuje jeho difuze. Navíc orálně podávané nanočástice léčiv vykazují silnou přílnavost k hlenovému povrchu gastrointestinálního traktu, což způsobuje ještě lepší vstřebatelnost léčiva [32, 33].

Mezi všemi technikami, které vedou k redukci velikosti částic, je mokré mletí masivním top-down procesem výroby lékových nanočástic. Při této metodě jsou vzorek a mlecí koule míchány vysokou rychlostí ve vodném roztoku stabilizátorů (polymer, surfaktant). Opakovaným srážením mikronových částic vzorku s mlecími koulemi dochází ke snížení velikosti na nanometry. Stabilizátory se do mletí přidávají, aby se předešlo agregaci. Naopak polymerní stabilizátory mohou potlačit růst částic během mletí nebo skladování [32, 33].

Tento způsob mletí je časově i energeticky velmi náročný. Procesní parametry, jako jsou rychlost míchání, množství mlecích koulí či množství léčiva, významně ovlivňují rychlost rozpadu a zároveň i čas mletí. Mokré mletí je zvláště vhodné pro léčiva s vysokým obsahem zbytkové vlhkosti. Konečným produktem mokré mikronizace je nanosuspenze léčiva. Pro zlepšení stability, udržitelnému výrobnímu procesu a také pro jednoduchou orální aplikaci se nanosuspenze transformuje do pevné lékové formy [32, 33].

### **2.2.3 Kryogenní mletí**

Kryogenní mletí neboli kryomletí je metoda, která se používá především pro měkké, elastické či plastické, nekřehké a termolabilní materiály. Při tomto mletí se využívá kryogenní kapaliny, což je například tekutý dusík, tekutý argon a další. Tekutý dusík má jedinečné fyzikální a chemické vlastnosti. Tato kryogenní kapalina je málo reaktivní a rozpustná, má nízkou viskozitu a povrchové napětí a zároveň je široce dostupná na průmyslovém trhu [19, 32, 34].

Kryogenní mletí může probíhat dvěma způsoby. První způsob je, že nejprve dojde ke zmrazení materiálu v tekutém dusíku (-100-150 °C) a k následnému mletí. Při druhém způsobu je mletí uskutečňováno za kryogenních podmínek, to znamená již v přítomnosti kapalného

dusíku. Tekutý dusík se používá jako disperzní médium místo vody. Použitím kapalného dusíku dochází ke křehnutí materiálu, což umožní vznik a šíření trhlin, snížení energie potřebné k mletí a zkrácení doby mletí. Lyofilizace neboli mrazové sušení, poskytuje křehký a porézní materiál. Proto je tento způsob vhodný spíše pro kapaliny nebo tuhé materiály, které obsahují vyšší obsah zbytkové vlhkosti [19, 32, 34].

Výhodou kryogenního mletí je, že minimalizuje degradaci termolabilních léčivých látek a ztrátu těkavých léčivých sloučenin. Snižuje riziko výbuchu, oxidaci složek léčiva a agregaci částic během mletí. Tyto výhody jsou důsledkem použití kapalného dusíku, který má nízké povrchové napětí a viskozitu. Průnikem dusíku do všech prázdných prostorů a do mikropórů částic se vytvoří fyzikální bariéra, která zabraňuje agregaci. Výhodou tekutého dusíku je, že odvádí uvolněné mechanické teplo. Vysoký účinek kryogenního mletí umožňuje výrobu zcela amorfní látky, která může být jinak těžce získána mletím při pokojové teplotě. Amorfizace léčiva ovšem nemusí být vždy výhodná z hlediska stability. Kryomletí umožňuje výrobu submikronových částic i nanočástic, ovšem tato metoda není ve farmaceutickém průmyslu široce realizována [19, 32, 34].

## **2.2.4 Vybrané metody pro zvýšení efektivity mletí**

### ***In situ mikronizace***

Další metodou, která se využívá pro výrobu mikronizovaných částic, je *in situ* mikronizace. Celý proces spočívá v přípravě mikronizovaných částic během výrobního procesu, proto není nutná žádná další úprava. Na rozdíl od ostatních metod, které vyžadují jistou mechanickou sílu pro mikronizaci částic, při *in situ* mikronizaci vznikají mikronizované částice již během krystalizace. Tato metoda nevyžaduje žádnou úpravu až na mírnou úpravu reakčních podmínek použitím magnetického míchadla. Výhodou je menší časová náročnost metody, homogenní distribuce velikosti částic, kontrola velikosti částic během výrobního procesu a menší pravděpodobnost fyzikální či chemické degradace [29].

Během mikrokrytalizace lze použít hydrofilní polymer jako stabilizační činidlo. Stabilizační činidlo modifikuje povrch hydrofobního mikrokrytal, jehož důsledkem je

zastavení krystalizace, stabilizace krystalu a zlepšení rozpustnosti. Typ stabilizačního činidla má zásadní vliv na morfologii výsledných mikrokystalů [29].

*In situ* mikronizace může probíhat dvěma způsoby. První způsob spočívá ve smíchání rozpuštěného léčiva s precipitačním médiem, které je tvořeno hydrofilním polymerem rozpuštěným ve vodě. Obě směsi jsou smíchány v poměru 1:4 nebo 1:8 [29]. Výsledné mikrokristaly jsou následně vysušeny sprejovým sušením nebo v sušárně. Hydrofilní polymer se adsorbuje na částice léčiva a zastavuje krystalizaci. Druhý způsob je vhodný pro léčiva, jejichž rozpustnost je závislá na pH. Proces spočívá v pomalé změně pH systému ze zásaditého na kyselé, nebo naopak [29].

### ***Tryskové mletí s povrchovou úpravou***

Mikronizace probíhající současně s úpravou povrchu částic léčiva se používá za účelem omezení nevýhod samotné mikronizace. Při samotné mikronizaci může dojít k aglomeraci částic a snížení celkové hustoty. Úprava povrchu léčiva probíhá za přítomnosti hydrofilního nano-oxidu křemičitého, který je přidáván k léčivu před mletím v tryskovém mlýně. Tato úprava povrchu vede ke zlepšení rozpustnosti mikronizovaných částic léčiva. Pokud je navíc během mletí k léčivu přidán ve vodě rozpustný polymer, dojde ke zvětšení celkové hustoty a k ještě lepší rozpustnosti částic [35].

Tryskový mlýn využívá k mletí energii vysoce stlačeného vzduchu. Proces probíhá za sucha bez přítomnosti rozpouštědla, tudíž je riziko kontaminace velice malé. Tryskové mletí je vhodné i pro léčiva citlivá na teplotu poněvadž při mletí nedochází k zahřívání částic vzhledem k možnosti průběžně přidávat léčivo. Tato metoda umožňuje přípravu velkého množství mikronizovaných částic [35].

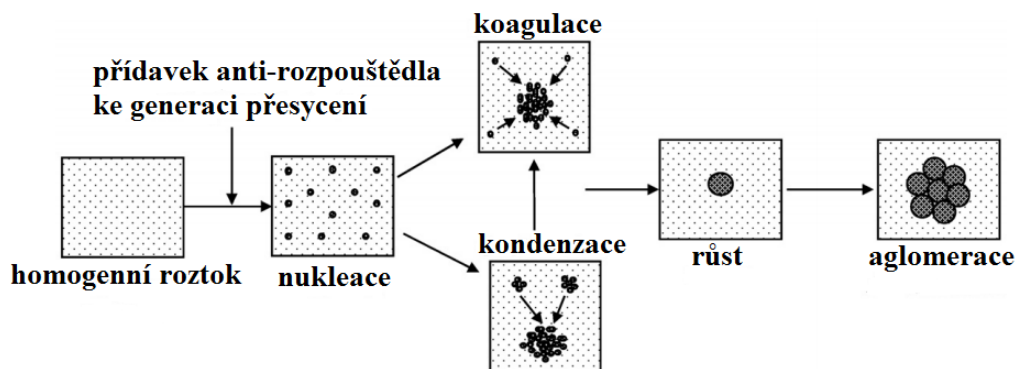
## **2.3 Metody mikronizace – srážecí techniky**

Srážecí reakce jsou bottom-up přístupy redukce velikosti částic. Bottom-up metody jsou metody „zdola-nahoru“, kdy jsou částice tvořeny z jednotlivých atomů. Zjednodušeně, léčivo

je rozpuštěno v organickém rozpouštědle a po přidání anti-rozpouštědla se vysráží za přítomnosti stabilizátoru. Dojde k precipitaci krystalů. Následný růst krystalů je kontrolován přidavkem polymeru či stabilizátoru k tvorbě jemných částic. Různé adaptace tohoto přístupu zahrnují: metodu rozpouštědla a anti-rozpouštědla, metodu superkritických tekutin, sušení rozprašováním a metodu odpařování emulze-rozpouštědlo. Technika bottom-up zahrnující rozpouštědla a anti-rozpouštědla vyžaduje rozpouštění léčiva v rozpouštědle, které je pak přidáno do anti-rozpouštědla [36].

Technika nanoprecipitace neboli výměna rozpouštědla, která využívá srážecích reakcí, představuje mnoho výhod. Především se jedná o jednoduchý, rychlý a snadný proces. Nanočástice se vytvářejí okamžitě a celý postup se provádí v jediném kroku. Srážení se skládá z přesycení, nukleace a následného růstu. Tato technika vyžaduje dvě rozpouštědla, která jsou mísitelná. Mechanismus je založen na principu rozpouštění polymeru a léčiva v prvním systému (rozpouštědlo), ale nesmí dojít k rozpuštění v systému druhém (anti-rozpouštědlo). Takzvaná nanoprecipitace nastane rychlou desolvací polymeru, poté co je polymerní roztok přidán k anti-rozpouštědlu. Jakmile se rozpouštědlo obsahující polymer difunduje do druhého systému, polymer se vysráží a dochází k okamžitému zachycení léčiva. K rychlému vzniku nanočástic dochází v důsledku mezifázových turbulencí. Ty probíhají na rozhraní rozpouštědla a anti-rozpouštědla. To vyplývá z komplexních a kumulovaných jevů jako jsou proudění, difuze a povrchové napětí. Nanoprecipitace umožňuje přípravu částic o rozměrech 100-300 nm s úzkou distribucí. Metoda nevyžaduje míchání, tření ani vysokou teplotu což jsou podmínky, které by mohly léčivo poškodit. Navíc není vždy nutné použití surfaktantů a toxických organických rozpouštědel. Nevýhoda metody spočívá v tom, že je většinou použitelná pouze pro léčiva s hydrofobním charakterem. Správnou volbou rozpouštědla a anti-rozpouštědla lze do jisté míry tuto metodu aplikovat i na hydrofilní léčiva [37].

Srážení pomocí kapalného anti-rozpouštědla se používá k vysrážení nano/mikro částic různých léčivých látek. Srážení probíhá v následujících krocích smíchání rozpouštědla a anti-rozpouštědla, generování přesycení, nukleace, růst koagulací a kondenzací, v případě nekontrolovaného růstu následuje aglomerace (Obrázek 5) [38].



Obrázek 5: Schéma precipitace částic [38].

Hnací silou srážení je rychlé a velké přesycení. Vlastnosti krystalu, jako je velikost, morfologie a čistota, jsou závislé na rychlosti, velikosti a rovnoměrnosti přesycení generovaného během procesu krystalizace. Přesycení jednosložkových krystalů v kapalině je definováno jako [38]:

$$S = \frac{c}{c^*} \quad (2.6)$$

kde  $c$  je skutečná koncentrace aktivních farmaceutických látek v roztoku [mol/l] a  $c^*$  je rovnovážná rozpustnost aktivních farmaceutických látek ve směsi organického rozpouštědla a anti-rozpouštědla [mol/l]. Bylo prokázáno, že vyšší stupeň přesycení má obvykle za následek nižší Gibbsovu volnou energii, která vede k vyšší míře nukleace. Energetická bariéra precipitace částic z nasyceného roztoku závisí na šířce metastabilní zóny. Metastabilní zóna je koncentrační rozmezí, kde není pozorována krystalizace během daného času. Pokud je metastabilní zóna široká je obtížné vyvolat nukleaci. Proto za účelem dosažení vyššího rozmezí nukleace by šířka metastabilní zóny měla být kratší. Dalším důležitým parametrem je indukční čas. Indukční čas je doba, která uplynula během přesycení suspenze a vzniku pozorovatelných krystalů. V případě, že je přesycení využito na nukleaci, nikoliv na růst částic dochází ke vzniku nanočástic. Pro výrobu nanočástic s úzkou distribucí velikosti částic je nutné zajistit vysoký stupeň přesycení, uniformní distribuci koncentrace v roztoku a zabránit růstu krystalů [38].

## 2.4 Metody mikronizace - superkritická fluidní extrakce

Možnost použití superkritických kapalin umožnilo vyvinout nové technologie nebo nahradit tradiční technologie založené na použití organických rozpouštědel. Vlastnosti pevných materiálů v mikro a nanoměřítku jsou závislé na chemickém složení a velikosti částic. Použití superkritických kapalin jako extrakčního média je slibnou alternativou pro výrobu léčiv a farmaceutických excipientů [39].

Konvenční metody k redukci velikosti částic (například tryskové mletí, kulový mlýn) vyžadují krystalizaci materiálu před pokračováním procesu. Během této fáze krystaly rostou nekontrolovatelně. Je-li mechanická síla použita ke snížení velikosti krystalu, částice většinou získají nabitý povrch a stanou se více přilnavé. Kromě této nevýhody jsou zde i další. Procesy jsou časově náročné a nákladné, je při nich obtížná kontrola distribuce velikosti částic. Navíc jsou výše zmíněná organická rozpouštědla toxická a mohou u rekrystalizovaných léčiv překročit povolený limit [39].

Existují dva hlavní důvody pro použití superkritické fluidní extrakce. Jednak, selektivní solvatační síla superkritických kapalin umožní oddělit jednu složku z vícesložkové směsi. A pak, vysoká rozpustnost rozpouštědla v superkritické kapalině umožňuje rychlé sušení připravených částic a nízký podíl zbytkového rozpouštědla. Volba metody závisí na rozpustnosti materiálu [39].

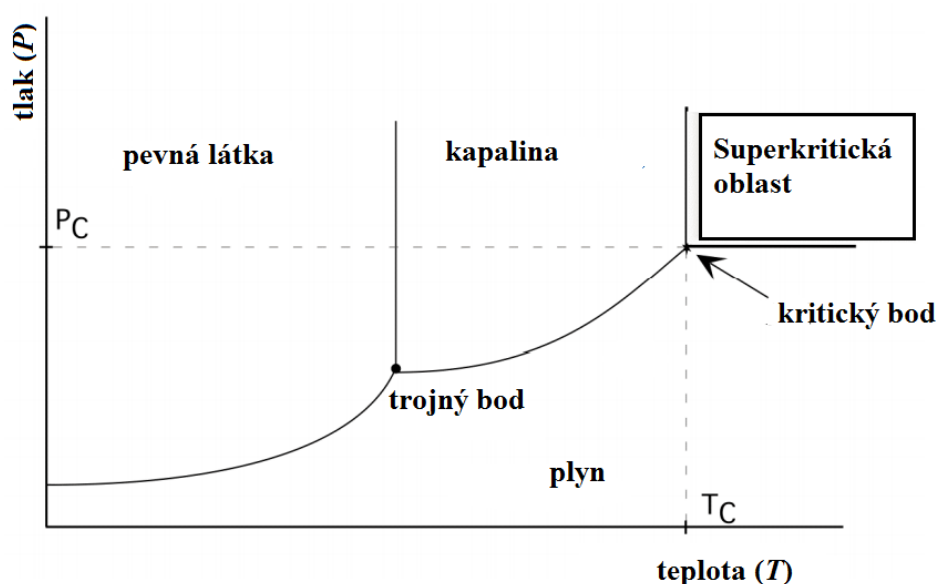
### 2.4.1 Superkritické kapaliny

Superkritické kapaliny byly objeveny roku 1822. Teprve roku 1980 jejich významnost pro chemickou syntézu vzrostla. Superkritické kapaliny představují látky, u nichž jsou tlakové a teplotní hodnoty nad kritickými hodnotami. V kritickém bodě je hustota plynná a kapalná fáze stejná a mezi těmito fázemi není rozdíl. Tyto kapaliny jsou vysoce stlačitelné. Kombinace viskozity, difuzivity, hustoty a solvatačních vlastností vytváří ze superkritické kapaliny vynikající rozpouštědlo (viz Tabulka II) [40, 41].

Tabulka II: Fyzikálně-chemické vlastnosti plynů, kapalin a superkritických kapalin [40]

	<b>hustota (<math>\text{kg/m}^3</math>)</b>	<b>viskozita (<math>\text{mPa}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>difuzivita (<math>\text{cm}^2/\text{s}</math>)</b>
<b>plyn</b>	0,8-1,3	0,01-0,03	0,1-0,2
<b>kapalina</b>	800-1200	0,4-1,1	0,00001-0,0001
<b>superkritická kapalina</b>	300-1000	0,05-0,01	0,0001-0,001

Výhodou těchto látek je, že jsou nekarcinogenní, netoxické, nemutagenní, nehořlavé a termodynamicky stabilní. Významným přínosem je možnost regulace termofyzikálních vlastností (difuzivita, hustota, dielektrická konstanta) změnou provozní teploty a tlaku. Kromě toho mají superkritické kapaliny vynikající tepelné vodivostní vlastnosti [41].



Obrázek 6: Tlakově-teplotní diagram pro čisté složky [40].

Malé změny teploty nebo tlaku v blízkosti kritického bodu (Obrázek 6) mohou výrazně změnit hustotu a tím i solubilizační sílu superkritické kapaliny. Z toho vyplývá, že fyzikálně-chemické vlastnosti se mohou výrazně měnit, aniž by došlo ke změně molekulární struktury [40].

Nejčastěji používanými a nejdůležitějšími superkritickými kapalinami jsou superkritický oxid uhličitý a superkritická voda. Superkritický oxid uhličitý má velmi nízký kritický tlak ( $P_c = 73,8$  bar) a velmi nízkou kritickou teplotu ( $T_c = 31,3^\circ\text{C}$ ), proto je využíván při procesech citlivých na teplo. Navíc je superkritický oxid uhličitý netoxický, nehořlavý, zabraňuje oxidační



degradaci a má relativně velkou rozpouštěcí sílu ve srovnání s jinými superkritickými kapalinami. Nevýhodou superkritického oxidu uhličitého je, že není polární [40].

### ***Seznam metod využívajících superkritické kapaliny***

V závislosti na vlastnostech mohou být techniky rozděleny do dvou hlavních skupin. První skupina využívá superkritickou kapalinu jako rozpouštědlo, druhá skupina využívá superkritickou kapalinu jako anti-rozpouštědlo [40, 42].

Pokud je superkritická kapalina použita jako rozpouštědlo, musí v ní být látka rozpuštěna. Patří zde metoda rychlé expanze superkritické směsi (RESS), rychlé expanze superkritické směsi do kapalného rozpouštědla (RESSOLV), rychlé expanze superkritické směsi do vodného roztoku (RESSAS) a metoda rychlé expanze superkritické směsi s anti-rozpouštědlem (RESS-N) [40, 42].

Pokud je superkritická kapalina použita jako anti-rozpouštědlo, dojde ke kontaktu s roztokem rozpuštěné látky. V této skupině se nachází proces využívající anti-rozpouštědla v plynném stavu (GAS), superkritického anti-rozpouštědla (SAS), extrakčního systému s rozpouštědlem ve stavu aerosolu (ASES), roztoku dispergovaného superkritickou kapalinou (SEDS), stlačeného anti-rozpouštědla (PCA) nebo metoda atomizace rychlým vstřikováním určená pro extrakci rozpouštědlem (ARISE) [40, 42].

#### **2.4.2 Rychlá expanze superkritické směsi a její modifikace (RESS)**

Metoda rychlé expanze superkritické směsi byla patentována v roce 1986 a využívá rozpouštěcích schopností superkritického oxidu uhličitého. Čistý oxid uhličitý je stlačený na požadovaný tlak a předehřátý na extrakční teplotu pomocí teplotního výměníku. Následně dojde k extrakci vstupního materiálu superkritickým oxidem uhličitým. Po rozpuštění je směs následně expandována pomocí trysky do expanzní komory, ve které je atmosférický tlak. Rychlým snížením tlaku dojde k přesycení, protože se rozpouštěcí síla superkritické kapaliny snižuje. Nukleace probíhá v plynné fázi, což zajišťuje dobrou výslednou velikost a distribuci

částic. Velikost a morfologie částic může být ovlivněna změnou různých parametrů (úprava tlaku a velikosti trysky). Morfologie výsledného pevného materiálu je závislá na struktuře vstupního materiálu (krystalický, amorfni, kompozitní,...) a na parametrech RESS metody (teplota, pokles tlaku, geometrie trysky, atd.) [40, 42, 43].

Výhodou této metody je, že poskytuje jednotnou distribuci velikosti částic. Částice jsou bez rozpouštědla, tudíž nevyžadují další náročné zpracování. Limitujícím faktorem je rozpustnost léčiva v superkritickém oxidu uhličitém, která by měla dosahovat hodnoty  $10^{-4}$ . Pokud by této hodnoty dosaženo nebylo, je možné rozpustnost zvýšit přidáním dalšího rozpouštědla v kapalně nebo plynné formě. Je důležité, aby toto rozpouštědlo bylo odstraněno z výsledného produktu. Proto se metoda používá pouze pro materiály rozpustné v superkritickém oxidu uhličitém. Další nevýhodou je, že může dojít k poškození léčiva vlivem vysokého tlaku [40, 42, 43].

Modifikací metody RESS je metoda RESS-N. Tato metoda se používá pro přípravu polymerních mikročástic nebo proteinových mikrokapsulí. Charakteristickým znakem metody je použití dalšího rozpouštědla ke zlepšení rozpustnosti. Toto rozpouštědlo nesmí nijak ovlivňovat vstupní polymer. Obvykle se využívá kapalných organických rozpouštědel, která znečišťují výsledný produkt. Rychlá expanze superkritické směsi do kapalného rozpouštědla (RESSOLV) je další modifikací RESS. Při teoretických simulacích metody RESS byl dokázán vznik nanočástic, avšak při praktickém provedení vznikají pouze mikročástice vlivem různých kolizních a aglomeračních mechanismů. RESOLV využívá k omezení růstu částic v expanzní komoře kapalně rozpouštědlo se stabilizačním činidlem. Díky tomu je možné získat částice pod 100 nm. RESSAS je modifikací RESOLV. V expanzní komoře metoda využívá vodný roztok se surfaktantem (polysorbáty, lecitin) jako stabilizačním činidlem. Tryska je ponořena do vodného roztoku, aby nedocházelo ke vzniku pěny v důsledku proudění superkritického oxidu uhličitého, je na povrch kapaliny v komoře rozprašován dusík [40, 43].

### **2.4.3 Metoda anti-rozpouštědla v plynném stavu (GAS)**

Protože jedním z hlavních omezení metody RESS je špatná rozpustnost polárních látek v superkritickém oxidu uhličitém, došlo k vývoji metody, která využívá superkritický oxid uhličitý jako anti-rozpouštědlo. Mechanismus je založen na faktu, že rozpouštědlo ztrácí svou

rozpouštěcí schopnost, když je dostatečně expandováno plynem. Léčivo je rozpuštěno v rozpouštědle, které je expandováno superkritickým oxidem uhličitým. Superkritický oxid uhličitý je rozpuštěn v rozpouštědle, vzhledem k tomu, že léčivo není rozpustné v superkritickém oxidu uhličitém, dochází k přesycení a vysrážení léčiva. Pomocí metody GAS je vyrobeno jen takové množství produktu, které odpovídá množství vstupního materiálu [42, 43].

Precipitační nádoba je z části naplněna roztokem rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěné léčivo, které chceme mikronizovat. Oxid uhličitý má požadovaný tlak a následně je přiveden do precipitační nádoby. Aby byla směs dobře promíchána, je superkritický oxid uhličitý přiváděn ze spodní strany nádoby. Dochází k expanzi rozpouštědla, které tímto ztrácí svou rozpouštěcí schopnost. Koncentrace léčiva se zvyšuje, což způsobí vysrážení částic léčiva. Po ukončení srážení je expandované rozpouštědlo vypuštěno za izobarických podmínek a vysrážené částice jsou promyty. Hlavní výhodou u GAS metody je mikronizace polárních látek, lze dosáhnout velikosti 0,5-500  $\mu\text{m}$ . Nevýhoda spočívá v použití organického rozpouštědla, které může způsobit znečištění výsledného produktu [42, 43].

#### **2.4.4 Metoda superkritického anti-rozpouštědla (SAS)**

Metoda superkritického anti-rozpouštědla je modifikací metody GAS, kdy výroba probíhá kontinuálně. Oxid uhličitý i roztok léčiva v rozpouštědle je možno přivádět do precipitační nádoby současně nebo střídavě. Precipitace je ukončena přivedením čistého superkritického oxidu uhličitého, u kterého dojde ke snížení tlaku. To má za následek odstranění rozpouštědla a znečištění vysrážených částic. Navíc dochází k vysušení vysrážených částic. Výhodou metody je možnost připravit nanočástice, ty však nejsou monodisperzní, protože dochází k aglomeraci [43].

## **2.4.5 Metoda extrakčního systému s rozpouštědlem ve stavu aerosolu (ASES)**

Metoda je založena na nástřiku roztoku (jemných kapiček) do stlačeného oxidu uhličitýho pomocí atomizační trysky. Dochází ke smícháním superkritické kapaliny s kapičkami, to je doprovázeno zvětšením objemu a následně zhoršením vlastností kapalného rozpouštědla. To způsobuje prudký nárůst přesycení uvnitř tekuté směsi a následnou tvorbu malých jednotných částic. Superkritická tekutina je pumpována do horní části vysokotlaké nádoby pomocí vysokotlaké pumpy. Jakmile systém dosáhne ustáleného stavu (teplota a tlak), roztok účinné látky je tryskou přiveden ve formě malých kapiček do vysokotlaké nádoby. Částice jsou sbírány na filtr ve spodní části vysokotlaké nádoby. Tekutá směs (superkritická tekutina a rozpouštědlo) opouští nádobu a proudí do komory se sníženým tlakem, kde vlivem podmínek (teplota a tlak) dochází k separaci obou složek. Po sběru dostatečného množství částic je pumpování kapalného roztoku zastaveno. Čistá superkritická tekutina proudí nádobou za účelem odstranění zbytkového rozpouštědla z částic [42].

## **2.4.6 Metoda roztoku dispergovaného superkritickou kapalinou (SEDS)**

Cílem této metody je zvětšit intenzitu míchání superkritické tekutiny a roztoku pro zvýšení rychlosti přenosu. Tryska se dvěma souosými průchody umožňuje zavést superkritickou tekutinu a roztok účinné látky do vysokotlaké nádoby, ve které je nastavený tlak a teplota. Vysoká rychlost superkritické tekutiny umožňuje rozložit roztok na malé kapičky. Navíc, dochází k extrakci rozpouštědla z roztoku ve stejný čas, kdy dochází k jeho disperzi. Kansaská univerzita zveřejnila variantu, kdy konstrukce trysky vede k vývoji zvukové vlny, která umožní tvorbu velmi drobných částic o velikostech okolo 1  $\mu\text{m}$ . Přidáním nosiče (většinou polymeru) do roztoku je možné vytvořit mikro/nano obaly s obsahem aktivní látky [42].

### 3. PRAKTICKÁ ČÁST

V rámci praktické části byla provedena mikronizace cimetidinu. K redukci velikosti částic byly využity metody mikronizace - kulové a tryskové mletí a superkritická fluidní extrakce. V první části jsou uvedeny chemikálie a přístroje, které byly během přípravy a analýzy mikronizovaných částic cimetidinu používány. Přístroje, na kterých byly analýzy prováděny, patřily CNT VŠB – TUO, IT4Innovation a RMTVC. Dále jsou zde uvedeny použité metody přípravy, jejich popisy a postupy. V závěru jsou uvedeny metody charakterizace získaných vzorků, u kterých se očekávala změna velikosti částic, polymorfie.

#### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

Chemikálie použité v praktické části:

- cimetidin – Sigma Aldrich,
- demineralizovaná voda (zařízení Merck Millipore),
- dichlormethan – Sigma Aldrich,
- methanol – Sigma Aldrich,
- oxid uhličitý (čistota 4,8) – SIAD.

Přístroje použité v praktické části:

- extraktor Spe-ed SFE-4 firmy Applied Separation,
- analytické váhy – Tecator 6110 Balance,
- sušárna WSU 200,
- planetární kulový mlýn Fritsch pulveristte 7,
- tryskový mlýn Sturtevant,
- skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 FEG (FEI),
- FTIR spektrometr Nicolet 6700 FT-IR,
- rentgenový difraktometr Rigaku Ultima IV
- analyzátor nanočástic Nanopartica SZ (Horiba)
- přístroj Sorptomatic 1990 (Thermo Finnigan).

## 3.2 Procesy mikronizace léčiva

### 3.2.1 Mletí planetárním mlýnem

Pro přípravu částic cimetidinu byl použit planetární kulový mlýn Fritsch pulveristte 7 premium line. Tento planetární mlýn je dvoupozicový, obsahuje dvě mlecí achátové nádoby, do nichž je umístěn zdrojový materiál společně s mlecími kuličkami. Princip tohoto planetárního mlýna spočívá v rotaci mlecích misek kolem své vlastní osy. Zároveň probíhá rotace mlecích misek ve směru opačném kolem společné osy talířového disku, do něhož jsou mlecí misky zapuštěné.

V praktické části bylo provedeno suché mletí. Každá mlecí miska obsahovala 1,1 g navážky cimetidinu. Do každé mlecí misky se vzorkem byly přidány 3 mlecí kuličky. Mletí cimetidinu bylo realizováno dvakrát. V prvním případě mletí probíhalo při 500 otáčkách za minutu. Doba mletí byla nastavena na 15 minut po dvou cyklech. V druhém případě mletí probíhalo opět při 500 otáčkách za minutu. Doba mletí byla nastavena na 15 minut, místo dvou cyklů byly nastaveny čtyři cykly. (Tabulka III). Pomocí mletí v kulovém mlýně byl získán 1 g pomletých částic. Výtěžnost byla 90,9 %.

Tabulka III: Podmínky přípravy částic – planetární kulový mlýn

označení vzorku	navážka [g]	otáčky [rpm]	čas [min]	cykly mletí
CIM_2	1,1	500	15	2
CIM_3	1,1	500	15	4

### 3.2.2 Mletí tryskovým mlýnem

Pro mletí částic pomocí tryskového mlýna byl použit tryskový mlýn Sturtevant. Tryskový mlýn používá jako energii mletí stlačený vzduch, který experimentální vzorek přivádí do korundové mlecí komory a ovlivňuje průběh mletí. V mlecí komoře je vzorek mlet principem obrušování částice o částici. Na tryskovém mlýně bylo zpracováno 9,6 g navážky cimetidinu při tlaku mlecí nádoby 50 MPa. Zisk pomletých částic byl 2,9 g. Částice zůstávaly přichyceny v tryskovém mlýně. Pomocí mletí v tryskovém mlýně bylo získáno 2,9 g pomletých částic. Ztráta byla 69,8 %.

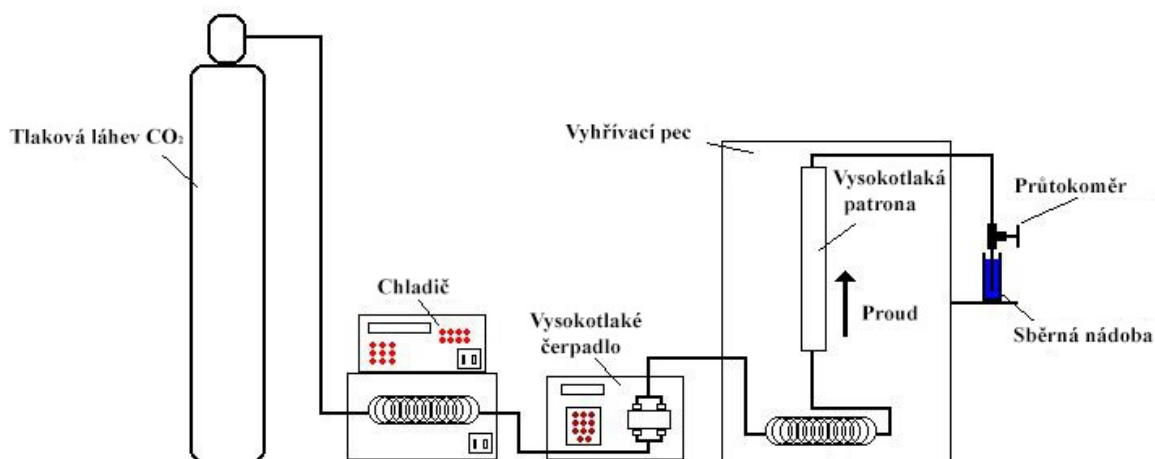
Tabulka IV: Podmínky přípravy částic – tryskový mlýn

označení vzorku	navážka [g]	tlak mlecí nádoby [MPa]
CIM_17	9,6	50

### 3.2.3 Superkritická fluidní extrakce

Pro přípravu submikronových částic a nanočástic cimetidinu byl použit extraktor Spe-ed SFE-4 firmy Applied Separation. Tento přístroj je určen pouze pro použití oxidu uhličitého jako superkritické tekutiny.

Extraktor se skládá z následujících částí. Kompresor přivádí stlačený vzduch do vysokotlakého čerpadla, ke kterému je připojen. Stlačený vzduch zajišťuje provoz čerpadla. Vysokotlaké čerpadlo pumpuje oxid uhličitý z tlakové láhve. K pumpování dochází pod daným tlakem. Požadovaný tlak lze nastavovat přímo na vysokotlakém čerpadle. Tlak může dosahovat hodnoty až 690 bar. Aparaturu extraktoru dále tvoří chladicí zařízení, které obsahuje chladicí kapalinu. Chladicí kapalina zajišťuje zvyšování tlaku oxidu uhličitého, proto je chladicí zařízení propojeno s vysokotlakým čerpadlem. S vysokotlakým čerpadlem je propojena i vyhřívací pec. Na vyhřívací peci je možné nastavovat teploty, teplotu pece a teplotu výstupu. Teplota může být nastavena až na 240 °C. Do vyhřívací pece jsou vkládány vysokotlaké patrony obsahující vzorky. Do vyhřívací pece je možné vložit čtyři vysokotlaké patrony. Na vyhřívací peci jsou umístěny otočné vstupní ventily. Pomocí těchto ventilů je vpouštěn do pece oxid uhličitý. K vyhřívací peci je napojeno výstupní sběrné zařízení s výstupními ventily. Výstupní zařízení tvoří hroty, vedoucí z přístroje a sběrné nádoby. Ke sběrným nádobám je připojen průtokoměr, kterým lze kontrolovat průtok oxidu uhličitého. Průtok lze nastavovat pomocí průtokových ventilů.



Obrázek 7: Schéma superkritického fluidního extraktoru [44].

Protože cimetidin není rozpustný v oxidu uhličitém, nemohla být použita RESS metoda. Z toho důvodu bylo použito metody GAS, kdy je oxid uhličitý použit jako anti-rozpouštědlo. Je potřeba, aby léčivo bylo prvně rozpuštěno v látce, ve které je rozpustné. Jako rozpouštědlo byl použit methanol [45].

Při přípravě vzorku byla nejprve navážka rozpuštěna v methanolu. Bylo zjištěno, že 0,1 g cimetidinu lze rozpustit vždy v 800  $\mu$ l methanolu. V menším množství rozpouštědla se navážku rozpustit nepodařilo. Po rozpuštění následovalo naplnění patrony. Vysokotlaká patrona je pro plnění nachystaná tak, že jeden její konec je uzavřen. Ten je vhodné si označit, protože do vyhřívací pece je vkládána patrona tak, aby tento konec směřoval nahoru. Do patrony je nejprve vkládána skelná vata, která je pýchovací tyčí stlačena a následně je vložena rozpuštěná navážka vzorku. Nevyplněné místo je zaplněno skleněnými kuličkami po okraj patrony a zbylá část je vyplněna opět skelnou vatou, kterou je nutno zase stlačit pýchovací tyčí. Následně je patrona uzavřena a vložena do vyhřívací pece. Stejný postup je proveden i pro ostatní patrony. Poté, co jsou patrony v peci, je nutné nastavit teplotu pece i výstupu. Následně je nutné vyčkat na vyhřátí pece na požadovanou teplotu, poté lze vpouštět do patron natlakovaný oxid uhličitý. Tato fáze se nazývá statický mód. Statický mód může trvat po zvolenou dobu, stejně tak jako po něm následující mód dynamický, kdy jsou puštěny výstupní ventily, a rozpouštědlo je přivedeno do sběrných nádob. Vzorek zůstává v patroně, ze které je po ukončení procesu odebrán. Problémem je ovšem zachytávání vzorku na skelné vatě. Aby byl vzorek odebrán k analýze, je potřeba jej oddělit od skelné vaty. Proto je vzorek na skelné vatě vložen do látky, ve které není



rozpuštěný. Pro cimetidin byl zvolen dichlormethan. Po odpaření byl vzorek odebrán a podroben analýze.

Podmínky přípravy spočívaly ve změně teploty pece, kdy byla teplota nastavena na 40, 50 a 70°C. Dále byl měněn tlak, kdy příprava probíhala při 150, 200 a 250 barech. Změna spočívala i v délce statického módu, který trval 20, nebo 40 min. Teplota výstupu nebyla měněna, neměla by na přípravu žádný vliv. Dynamický mód byl nastaven na 10 minut, po této době byl vzorek od zbylého rozpouštědla oddělen. Podmínky přípravy pro jednotlivé navážky cimetidinu jsou shrnuty v Tabulce V.

Tabulka V: Podmínky přípravy částic – superkritická fluidní extrakce

označení vzorku	navážka [g]	rozpouštědlo [ $\mu$ l]	teplota pec [°C]	teplota výstup [°C]	tlak [bar]	dynamický mód [min]	statický mód [min]
CIM_4	0,1062	800	40	110	200	10	20
CIM_5	0,1336	800	40	110	200	10	40
CIM_6	0,1055	800	40	110	250	10	20
CIM_7	0,1153	800	40	110	250	10	40
CIM_8	0,1140	800	40	110	150	10	40
CIM_9	0,1125	800	50	110	200	10	20
CIM_10	0,1157	800	50	110	200	10	40
CIM_11	0,1098	800	50	110	250	10	20
CIM_12	0,1005	800	50	110	250	10	40
CIM_13	0,1035	800	50	110	150	10	20
CIM_14	0,1046	800	50	110	150	10	40
CIM_15	0,1046	800	70	110	250	10	40
CIM_16	0,7603	6000	40	110	250	10	20

### 3.3 Metody charakterizace

Ke zjištění tvaru a velikosti částic cimetidinu byl použit skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 FEG (FEI). Snímky byly pořízeny v režimu sekundárních elektronů. Před analýzou bylo nutné vzorky naprášit vrstvou zlata respektive chromu, aby byla zajištěna vodivost vzorků.

K identifikaci a strukturní charakterizaci organických a anorganických látek byla použita metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Tato metoda je vhodná

i ke sledování polymorfie v oblasti „otisku palce“. Analýza byla provedena pomocí FTIR spektrometru Nicolet 6700 FT-IR, ten měřil metodou ATR. FTIR spektrometr je ovládán počítačovým softwarem OMNIC. Úprava spekter proběhla pomocí ATR korekce. Pásky, které ve spektrech odpovídaly přítomnosti CO<sub>2</sub>, byly odstraněny.

Ke zjištění změn v pozicích charakteristických píků a změně krystalinity byla použita rentgenová difrakční analýza. Tato metoda byla provedena pomocí rentgenového difraktometru Rigaku Ultima IV s Bragg-Brentanovým uspořádáním difraktometru (IT4Innovation). Detekce byla provedena pomocí scintilačního detektoru. Použita byla měděná rentgenová lampa. Měření vzorků probíhalo při hodnotách napětí 40 kV a proudu 40 mA. Rozsah měření byl nastaven od 2 do 60°, rychlost měření pak na 2,3°/min.

Ke změření velikosti částic a distribuce velikosti částic byl použit analyzátor nanočástic Nanopartica SZ (fa Horiba, IT4Innovation). Analýza probíhala mokrou cestou v destilované vodě. Z důvodu rozpustnosti částic cimetidinu ve vodném roztoku byl pro analýzu připraven přesycený roztok cimetidinu.

Měření specifického povrchu bylo provedeno na přístroji Sorptomatic 1990 od firmy Thermo Finnigan. Tento přístroj je určen k měření specifického povrchu a velikosti pórů.

## **4. Výsledky a diskuze**

Pomocí mletí v planetárním kulovém mlýnu, tryskovém mlýnu a technikou superkritické fluidní extrakce se podařilo připravit submikronové částice a nanočástice cimetidinu. Některé vzorky se nepodařilo úspěšně připravit, například z důvodu netěsnosti patron superkritické fluidní extrakce, některé připravené vzorky naopak nebylo možné použít k analýzám z důvodu malého množství připravené frakce. V Tabulce VI je přehled připravených vzorků a analýz, které byly provedeny.

Tabulka VI: Přehled vzorků a provedených analýz

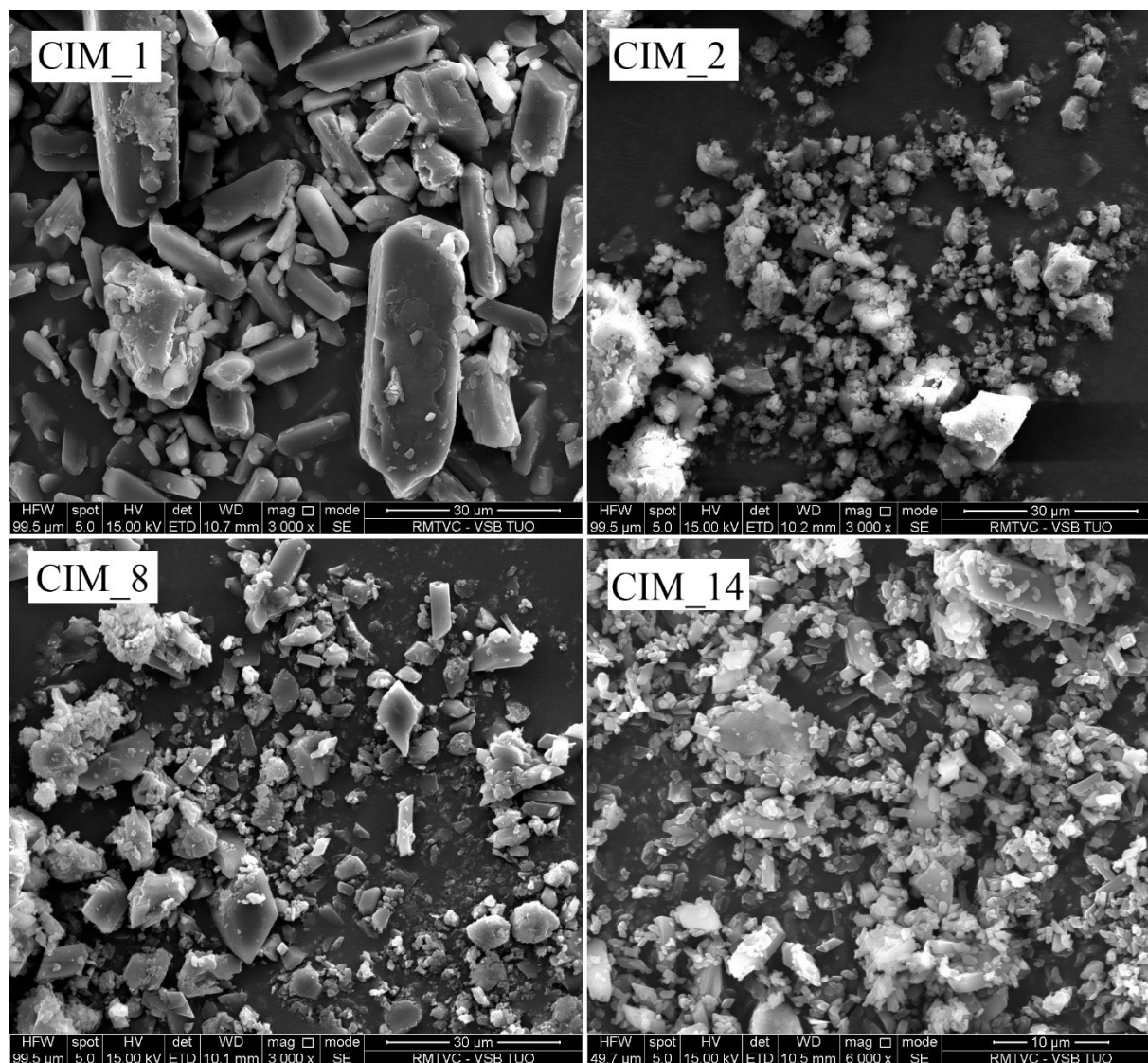
vzorek	provedené analýzy				
	SEM	FTIR	XRD	PSD	specifický povrch
CIM_1	ano	ano	ano	ano	ano
CIM_2	ano	ano	ano	ano	ano
CIM_3	ano	ano	ano	ano	ano
CIM_4	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_5	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_6	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_7	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_8	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_9	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_10	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_11	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_12	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_13	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_14	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_15	ano	ano	ano	ne	ne
CIM_16	ano	ano	ano	ano	ano
CIM_17	ano	ano	ano	ano	ano

## 4.1 SEM - skenovací elektronová mikroskopie

Ke zjištění tvaru a velikosti částic cimetidinu byl použit skenovací elektronový mikroskop Quanta 450 FEG (FEI). Částice původního vzorku cimetidinu se velikostně pohybovaly v rozmezí jednotek až desítek mikrometrů. Na Obrázku 8 lze pozorovat částice původního vzorku CIM\_1 s poměrně velkými velikostními rozdíly. Původní částice měly definovaný krystalický tvar a byla pozorována malá míra agregace. Po dvou patnáctiminutových (CIM\_2) a čtyřech patnáctiminutových (CIM\_3) cyklech mletí v planetárním kulovém mlýně byly získány menší částice, v jednotkách mikrometrů, pozorovány jsou i submikronové částice (Obrázek 8). Oproti původnímu vzorku měly částice nepravidelný tvar a vykazovaly velkou míru agregace.

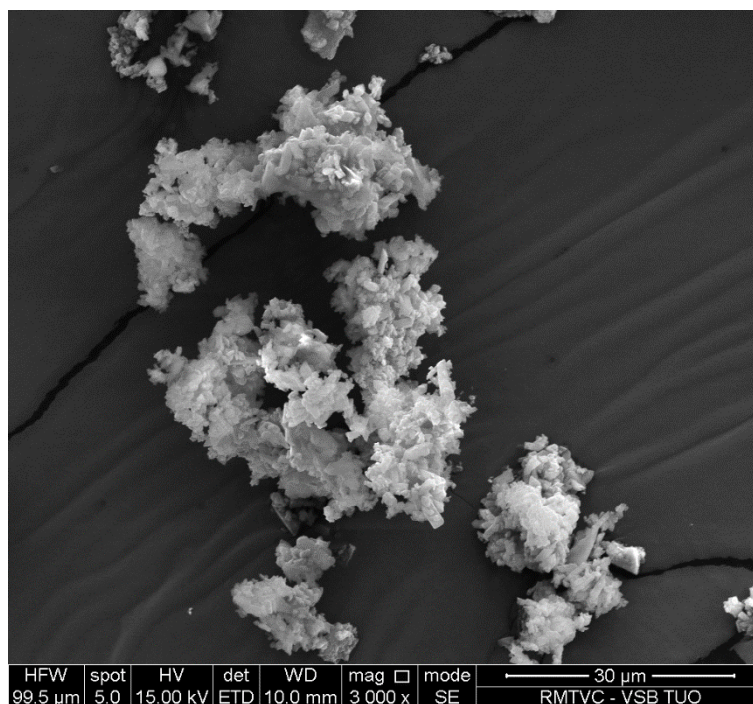
Přípravou částic pomocí superkritické fluidní extrakce při teplotě 40 °C se podařilo získat částice, které dosahovaly nejmenších velikostí při nejmenším tlaku, tj. 150 bar (CIM\_8). Stejně

tak tomu bylo i při teplotě 50°C, kdy opět velikostně nejmenší částice byly připravené při 150 barech (CIM\_14). To lze pozorovat na Obrázku 8.



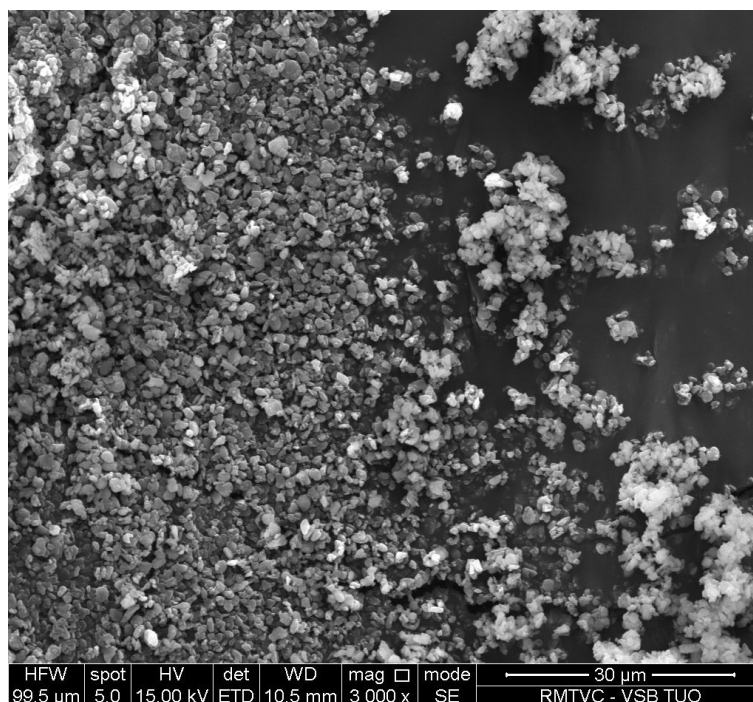
Obrázek 8: SEM snímek původního cimetidinu CIM\_1, kulovým mletím připraveného vzorku CIM\_2, superkritickou fluidní extrakcí připravených vzorků CIM\_8 a CIM\_14.

Při teplotě 70°C a tlaku 250 bar vykazovaly částice velkou míru agregace, to lze pozorovat na Obrázku 9, částice byly jehličkovitého tvaru (CIM\_15). Ze získaných SEM snímků by se dalo předpokládat, že doba statického módu také ovlivnila velikost. V Tabulce V, je 5 dvojic vzorků, kdy se v rámci dvojic měnila pouze doba statického módu. Ke zmenšení částic s rostoucím časem došlo pouze u vzorků CIM\_4 - CIM\_5 a CIM\_13 - CIM\_14. Velikost částic ovlivnila i teplota, se zvyšující se teplotou se velikost částic zmenšovala a na snímcích lze také pozorovat větší míru agregace u menších částic.



Obrázek 9: SEM snímek připraveného cimetidinu superkritickou fluidní extrakcí CIM\_15.

Porovnáním snímků z kulového mletí a superkritické fluidní extrakce se získanými snímky z tryskového mletí lze říci, že nejmenších částic bylo dosaženo jednoznačně při přípravě pomocí tryskového mletí (CIM\_17). To lze pozorovat na Obrázku 10. Při tryskovém mletí byl tlak v mlecí nádobě 50 MPa, což je přibližně 500 bar. Ze získaných dat vyplynulo, že za daných podmínek je vhodnější metodou přípravy submikronových částic a nanočástic tryskové mletí. Tryskové mletí je ale ekonomicky náročné a velmi ztrátové.



Obrázek 10: SEM snímek připraveného cimetidinu tryskovým mletím CIM\_17.

## 4.2 FTIR - infračervená spektroskopie

K identifikaci a strukturní charakterizaci vzorků byla použita metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Analyzovány byly vzorky z kulového a tryskového mletí, vzorky ze superkritické fluidní extrakce i vzorek původní. Infračervené spektrum původního vzorku CIM\_1 uvádí Obrázek 11. Při porovnání struktury cimetidinu (Obrázek 3) s FTIR spektry lze v oblasti  $2500\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  pozorovat, že dochází ke změnám v pásech  $\text{-OH}$  skupin, kdežto  $\text{-NH}$  skupiny zůstaly zachovány (Obrázek 12). Pro oblast  $2100\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$  je typická vibrační vazba  $\text{-CN}$ , která má charakteristickou hodnotu pro různé polymorfy. V rámci studie polymorfů bylo vypracováno několik studií, z nichž každá má vlastní značení. Hodnoty  $2176\text{ cm}^{-1}$ ,  $2166\text{ cm}^{-1}$  odpovídají polymorfům A, B. V našem případě se pomleté vzorky nejvíce blíží polymorfu A. Oblast „otisku palce“, což je oblast  $500\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ , je unikátní pro každou látku, lze zde pozorovat výraznou shodu charakteristických pásů s polymorfem A [46].

Pro vybrané vzorky, uvedené v Tabulce VII, bylo provedeno vyhodnocení polymorfie ze záznamů FTIR. Bylo zjištěno, že kromě výše uvedeného převažujícího polymorfu A, se u

připravených vzorků nachází i polymorf B. Vyskytují se i případy Z-izomerie, což je speciální případ cis-izomerie. Vyhodnocení bylo provedeno z FTIR spekter a podle následujících vzorců, pro polymorf B:

$$\% \text{ polymorfu B} = 217,485 \cdot \frac{A_b}{(A_b + A_a)} + 1,428 \quad (4.1)$$

kde 217,485 a 1,428 jsou konstanty z lineární regresní křivky,  $A_b$  a  $A_a$  jsou referenční hodnoty pro charakteristický pás polymorfu B. Výpočet pro Z-izomer:

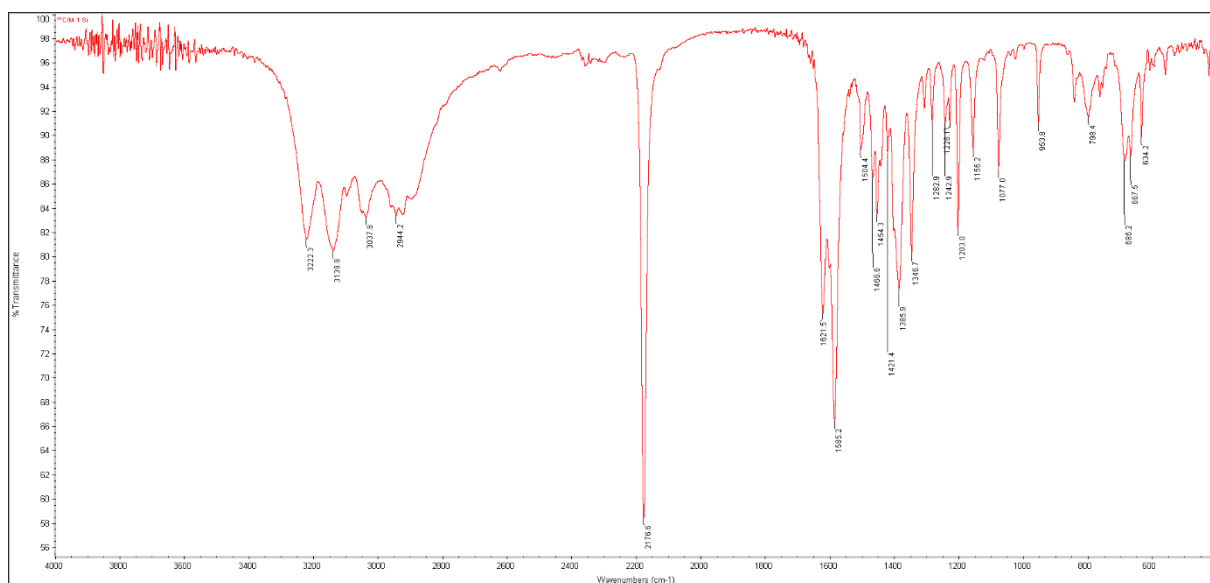
$$\% \text{ Z-izomeru} = 681,59 \cdot \frac{A_z}{(A_z + A_r)} + 0,183 \quad (4.2)$$

kde 681,59 a 0,183 jsou konstanty z lineární regresní křivky,  $A_z$  a  $A_r$  jsou referenční hodnoty pro charakteristický pás Z-izomeru.

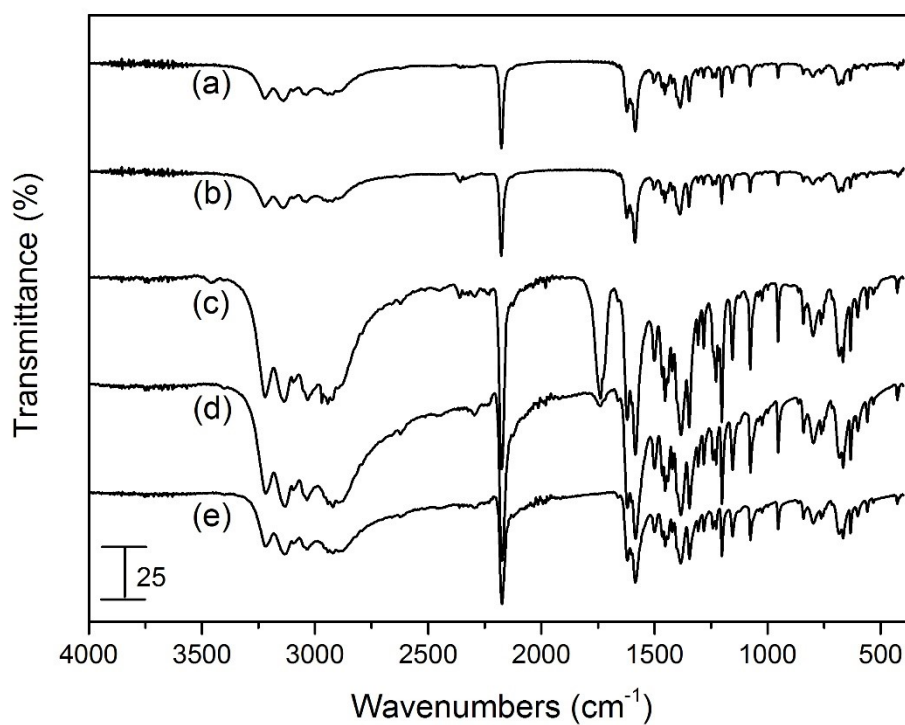
Tabulka VII: Procentuální zastoupení polymorfu B, Z-izomeru a polymorfu A

vzorek	polymorf B [%]	Z-izomer [%]	polymorf A [%]
CIM_1	0,70	3,75	95,55
CIM_2	0,53	4,02	95,45
CIM_3	0,65	5,46	93,89
CIM_4	0,34	2,00	97,66
CIM_5	0,59	3,25	96,16
CIM_6	0,70	1,11	98,19
CIM_16	1,14	1,58	97,28
CIM_17	-0,19	1,03	98,97

Procentuální zastoupení polymorfu B se u vzorků pohybuje v rozmezí -0,19-1,14 %. Pro mletí v kulovém mlýně a pro superkritickou fluidní extrakci je procentuální zastoupení polymorfu B srovnatelné. Nejmenší zastoupení polymorfu B je u tryskového mletí, to je -0,19 %, což znamená, že výskyt polymorfu je nepravěpodobný. Procentuální zastoupení Z-izomeru se ve vzorcích pohybuje v rozmezí 1,03-5,46 %. U kulového mletí je procentuální zastoupení Z-izomeru vyšší (4,02 % a 5,46 %) než u původního vzorku (3,75 %). U superkritické fluidní extrakce se zastoupení Z-izomeru pohybuje v rozmezí 1,11-3,25 %. U tryskového mletí je to pak 1,03 % Z-izomeru (viz Tabulka VII).



Obrázek 11: *FTIR spektrum původního vzorku: CIM\_1.*



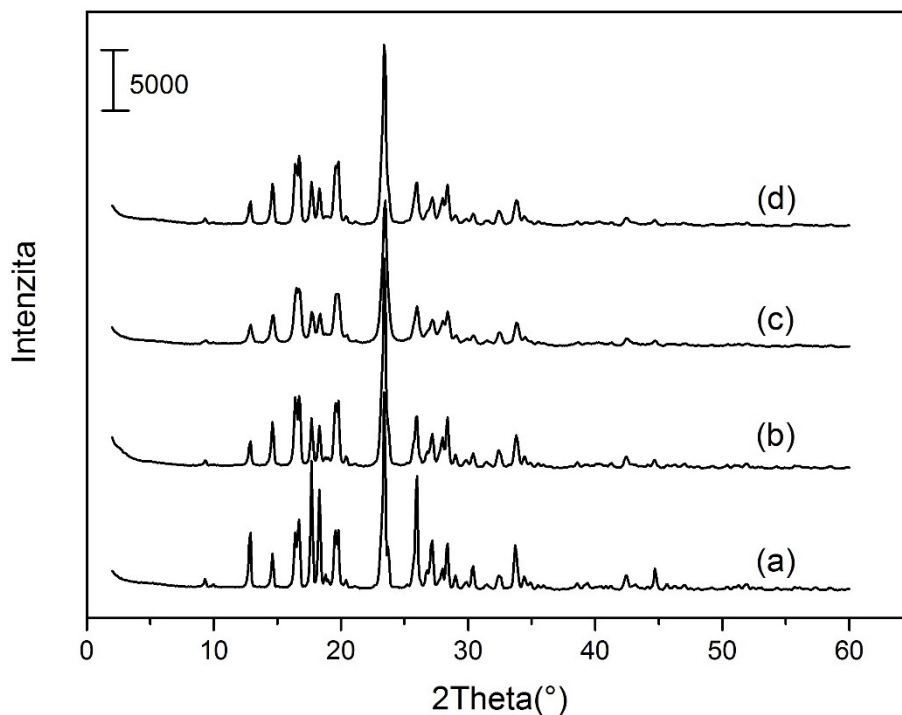
Obrázek 12: *FTIR spektra původního a vybraných připravených vzorků a) původní vzorek: CIM\_1, b) vzorek CIM\_2 (kulový mlýn), c) vzorek CIM\_17 (tryskový mlýn), d) vzorek CIM\_6 (superkritická fluidní extrakce), e) vzorek CIM\_16 (superkritická fluidní extrakce).*



### 4.3 XRD - rentgenová difrakční analýza

Rentgenová difrakční analýza byla provedena pomocí rentgenového difraktometru Rigaku Ultima IV s Bragg-Brentanovým uspořádáním difraktometru (IT4Innovation). Jednotlivé XRD záznamy odpovídají použitému léčivu cimetidinu. Vzorek CIM\_7 se nepodařilo z důvodu malého množství analyzovat.

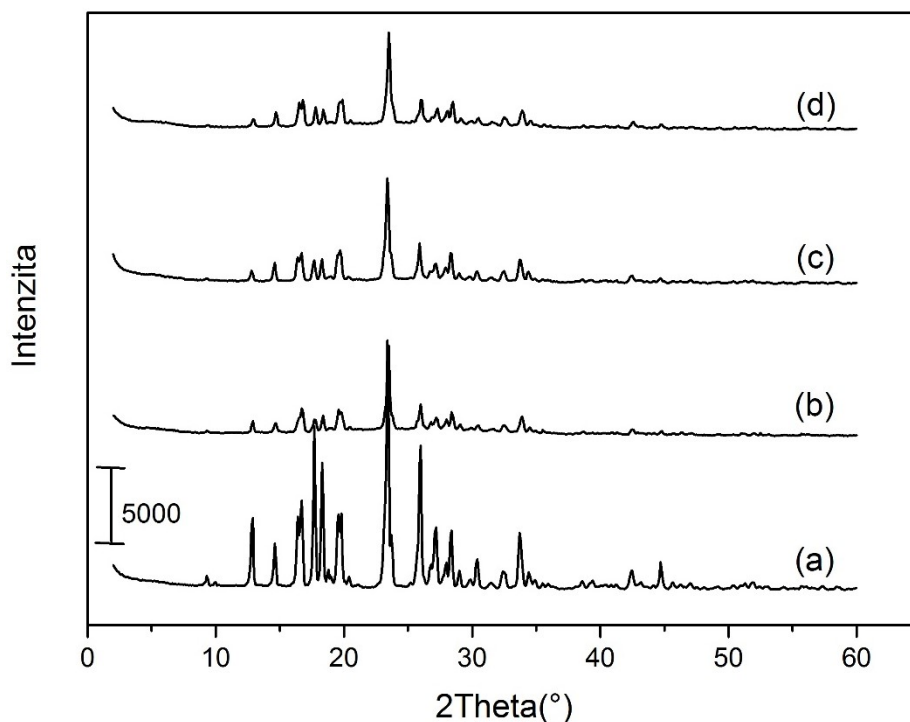
Na Obrázku 13 je XRD záznam původního vzorku a vzorků připravených mletím (viz Tabulka III a Tabulka IV). Na spektrech lze pozorovat, že oproti původnímu vzorku CIM\_1 dochází při mletí ke změnám poměrů intenzit některých difrakcí, lze tedy očekávat určité strukturní změny, ale mezi jednotlivými typy mletí už intenzity a pozice píků zůstávají zachovány.



Obrázek 13: XRD záznam původního a vzorků připravených mletím a) vzorek CIM\_1 (původní vzorek), b) vzorek CIM\_2 (kulový mlýn), c) vzorek CIM\_3 (kulový mlýn), d) vzorek CIM\_17 (tryskový mlýn).

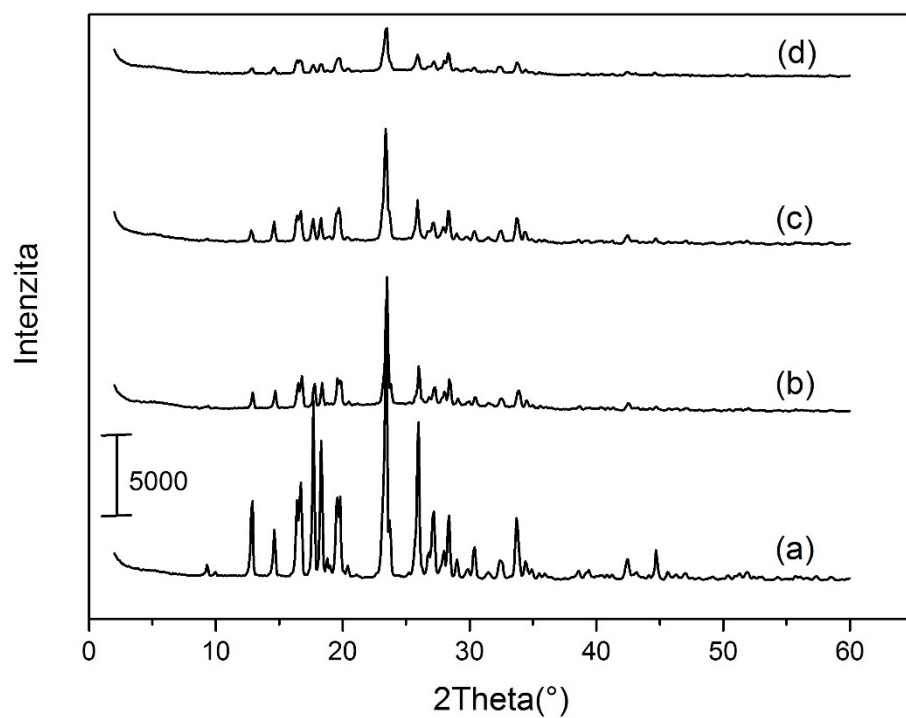
Na Obrázku 14 jsou uvedeny XRD záznamy analyzovaných vzorků CIM\_1, CIM\_2, CIM\_10 a CIM\_15, které byly připraveny pomocí superkritické fluidní extrakce. Tyto vzorky byly připravovány při různých teplotách: 40, 50 a 70°C. Na záznamech lze pozorovat, že pozice

všech píků zůstává zachována vzhledem k původnímu vzorku. Poměry intenzit připravených vzorků jsou menší oproti původnímu vzorku. Ke změnám intenzity mezi jednotlivými XRD záznamy, kde se měnila teplota, nedošlo. Z uvedeného lze usoudit, že teplota neměla na připravené částice vliv.

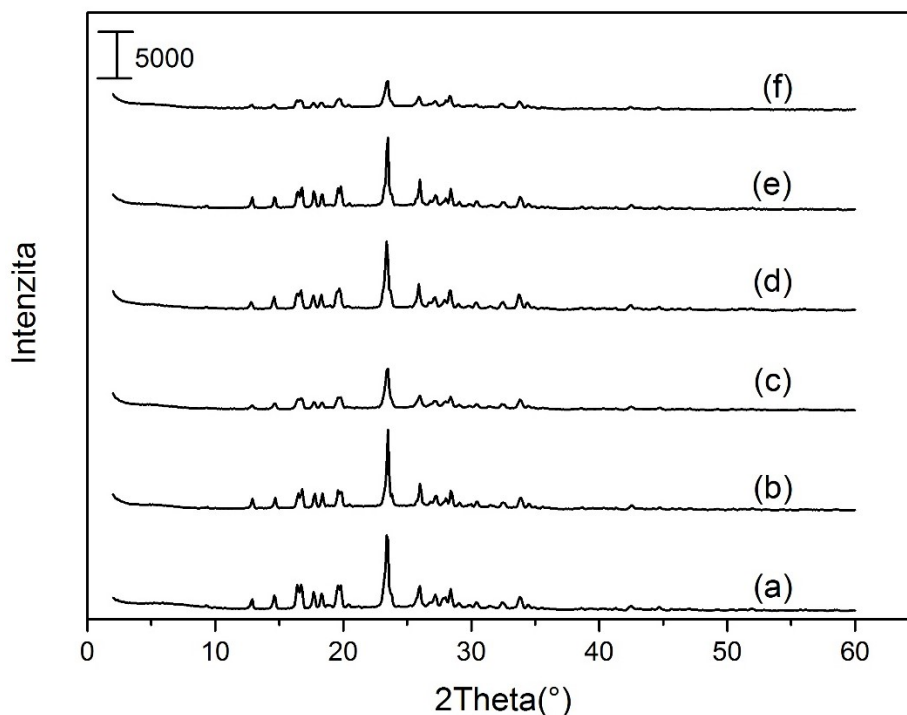


Obrázek 14: XRD záznam vzorků při různých teplotách pomocí superkritické fluidní extrakce a) vzorek CIM\_1 (původní vzorek), b) vzorek CIM\_5 (40°C), c) vzorek CIM\_10 (50°C), d) vzorek CIM\_15 (70°C).

Na Obrázku 15 jsou XRD záznamy připravených vzorků při různých tlacích, stejném statickém módu 40 minut a teplotě 50°C. Pozice píků zůstává zachována, mění se opět intenzita původního vzorku a vzorků připravených, přičemž nejmenší intenzitu lze pozorovat u vzorku CIM\_12. Dalo by se předpokládat, že čím vyšší tlak, tím menší částic. Toto tvrzení popírá výsledky ze SEM snímků. Vzorek CIM\_12 vykazuje nejmenší intenzitu i na Obrázku 16, kde jsou XRD záznamy připravených vzorků při různých tlacích a různých délkách statického módu.

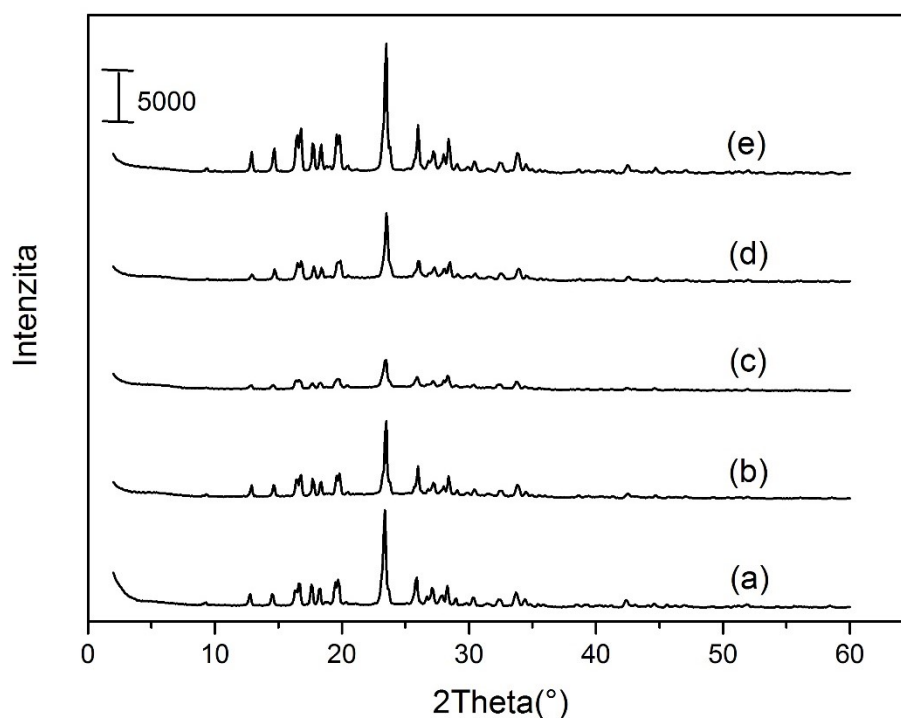


Obrázek 15: XRD záznam vzorků při různých tlacích, statickém módu 40 minut a teplotě 50 °C a) vzorek CIM\_1 (původní vzorek), b) vzorek CIM\_14 (150 bar), c) vzorek CIM\_10 (200 bar), d) vzorek CIM\_12 (250 bar).



Obrázek 16: XRD záznam vzorků při různých tlacích a statických módech a) vzorek CIM\_13 (150 bar, 20 min), b) vzorek CIM\_14 (150 bar, 40 min), c) vzorek CIM\_9 (200 bar, 20 min), d) vzorek CIM\_10 (200 bar, 40 min), e) vzorek CIM\_11 (250 bar, 20 min), f) vzorek CIM\_12 (250 bar, 40min).

SEM snímky bylo zjištěno, že nejmenší částice byly prokazatelně u tryskového mletí Obrázek 10. Porovnáním intenzit píků na Obrázku 13 a na Obrázku 15, bylo zjištěno, že píky na Obrázku 13 pro CIM\_17 jsou intenzivnější než píky na Obrázku 15 pro CIM\_12. Intenzita píků by mohla být ovlivněná velikostí částic, ale v tomto případě zřejmě došlo ke změně intenzity v závislosti na množství připraveného vzorku nebo nepovedenou šarží. Tuto skutečnost lze dobře vidět na Obrázku 17, u vzorků CIM\_6 a CIM\_16. Příprava těchto vzorků probíhala za stejných podmínek, lišila se pouze navážka. Vzorku CIM\_16 bylo připraveno více, intenzita jeho píků je větší než u vzorku CIM\_6.



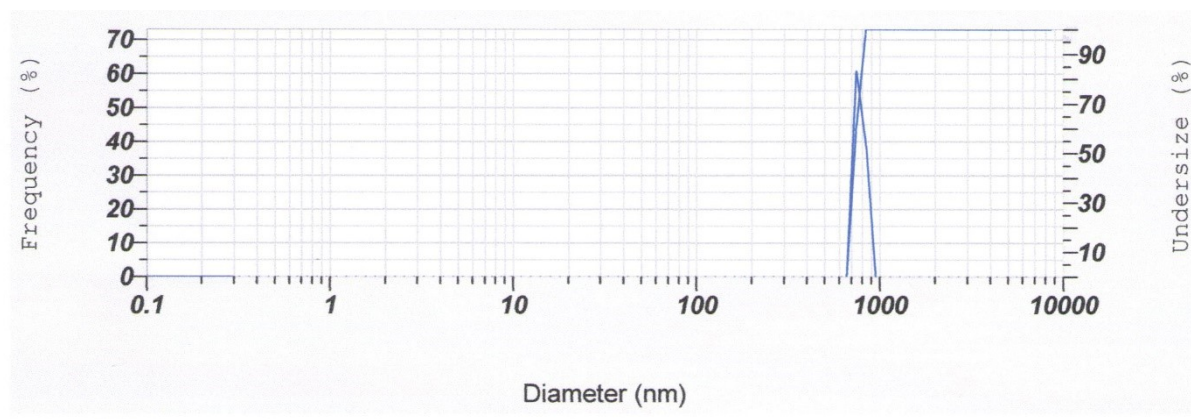
Obrázek 17: XRD záznam vzorků při různých teplotách a statických módech a tlaku 250 bar a) vzorek CIM\_6 (40 °C, 20 min), b) vzorek CIM\_11 (50°C, 20 min), c) vzorek CIM\_12 (50 °C, 40 min), d) vzorek CIM\_15 (70°C, 40 min), e) vzorek CIM\_16 (40°C, 20 min).

#### 4.4 PSD – analýza velikosti částic

Analýza velikosti částic a distribuce velikosti částic byla provedena na přístroji Nanopartica SZ (fa Horiba). Analýza probíhala mokrou cestou v destilované vodě. Z důvodu rozpustnosti částic cimetidinu ve vodném roztoku byl pro analýzu připraven přesycený roztok cimetidinu. Výsledky měření jsou uváděny pomocí průměrné velikosti částic ( $d_{50}$ ), distribuce velikosti částic je vyjádřena pomocí kumulativní a frekvenční křivky (Obrázek 18-20).

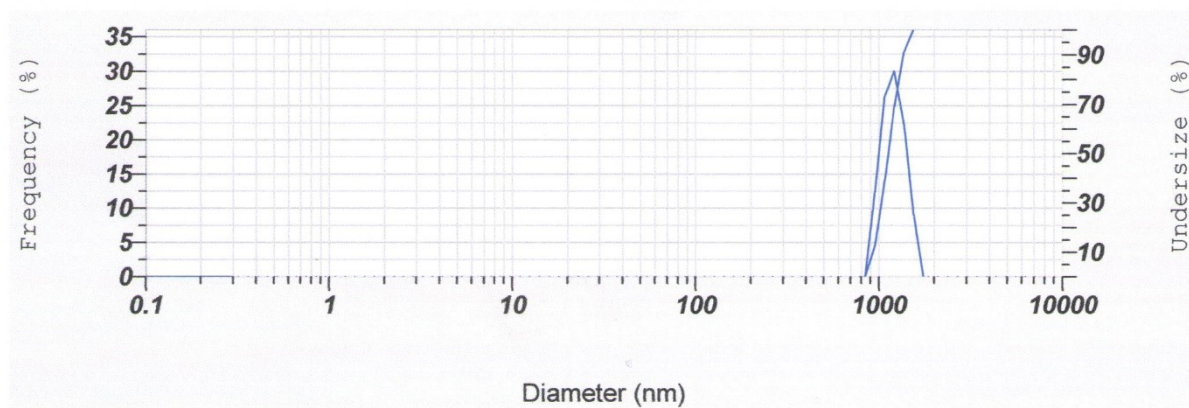
U původního vzorku se analýzou zjistilo, že vzorek měl velice širokou distribuci velikosti částic, byl vysoce polydisperzní. Průměrná velikost částic původního vzorku (CIM\_1) dosahovala 26,7  $\mu\text{m}$ . Samotný graf pro původní vzorek CIM\_1 nebyl zaznamenán z důvodu široké distribuce velikosti částic. Mletím částic cimetidinu docházelo k velikostní homogenizaci. U vzorku pomletého na kulovém planetárním mlýně (CIM\_2) došlo k redukci šířky distribuce velikosti částic (Obrázek 18). Průměrná velikost částic dosahovala 12,4  $\mu\text{m}$ .

Polydisperzní index tohoto vzorku byl 1,636, což znamená, že uvedená průměrná velikost částic je značně zkreslená. Modus, velikost částic vyskytujících se ve vzorku s největší frekvencí, vyšel 725,1 nm. Průměrná velikost částic je určována v závislosti na intenzitě odraženého světla, proto přítomnost velkých částic ve vzorku zkresluje výslednou průměrnou hodnotu velikosti částic, částice sedimentovaly již v průběhu měření. Naměřené hodnoty odpovídají snímkům ze SEM (Obrázek 8 – CIM\_1, CIM\_2).



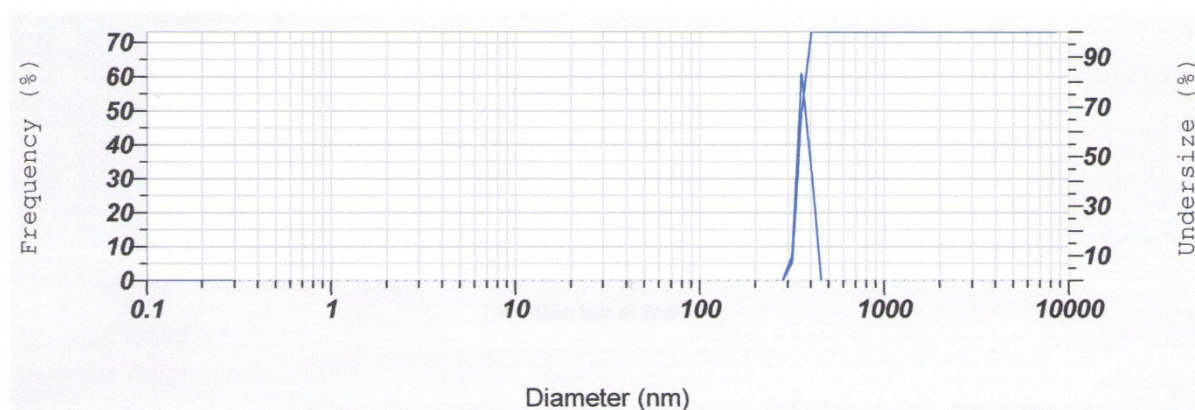
Obrázek 18: *Distribuce velikosti částic vzorku připraveného mletím v planetárním kulovém mlýně CIM\_2.*

Analýza vzorku připraveného planetárním kulovým mletím (CIM\_3), prokázala výrazné zmenšení velikosti částic cimetidinu, kdy průměrná velikost dosahovala 1,7  $\mu\text{m}$ . Polydisperzní index byl 11,033 a modus 1,1  $\mu\text{m}$ . Vzorek v průběhu měření silně agregoval a částice rychle v měřicí cele sedimentovaly. Agregace částic se projevila rovněž zvýrazněním širší distribuční křivky (Obrázek 19).



Obrázek 19: *Distribuce velikosti částic vzorku připraveného v planetárním kulovém mlýně CIM\_3.*

Nejužší šířku distribuce velikosti částic (Obrázek 20) měl vzorek připravený tryskovým mletím (CIM\_17). Částice vykazovaly velikostně homogenní charakter s průměrnou velikostí částic 0,4  $\mu\text{m}$ . To lze dobře pozorovat na snímcích ze SEM (Obrázek 10). Polydisperzní index byl 0,372, tudíž průměrná hodnota velikosti částic nebyla příliš zkreslená. Modus byl 0,3  $\mu\text{m}$ . Částice v průběhu měření nereagovaly, zůstávaly rozptýleny v měřící cele a tvořily bílý roztok.



Obrázek 20: Distribuce velikosti částic vzorku připraveného tryskovým mletím CIM\_17.

## 4.5 Srovnání specifického povrchu s distribucí velikosti částic

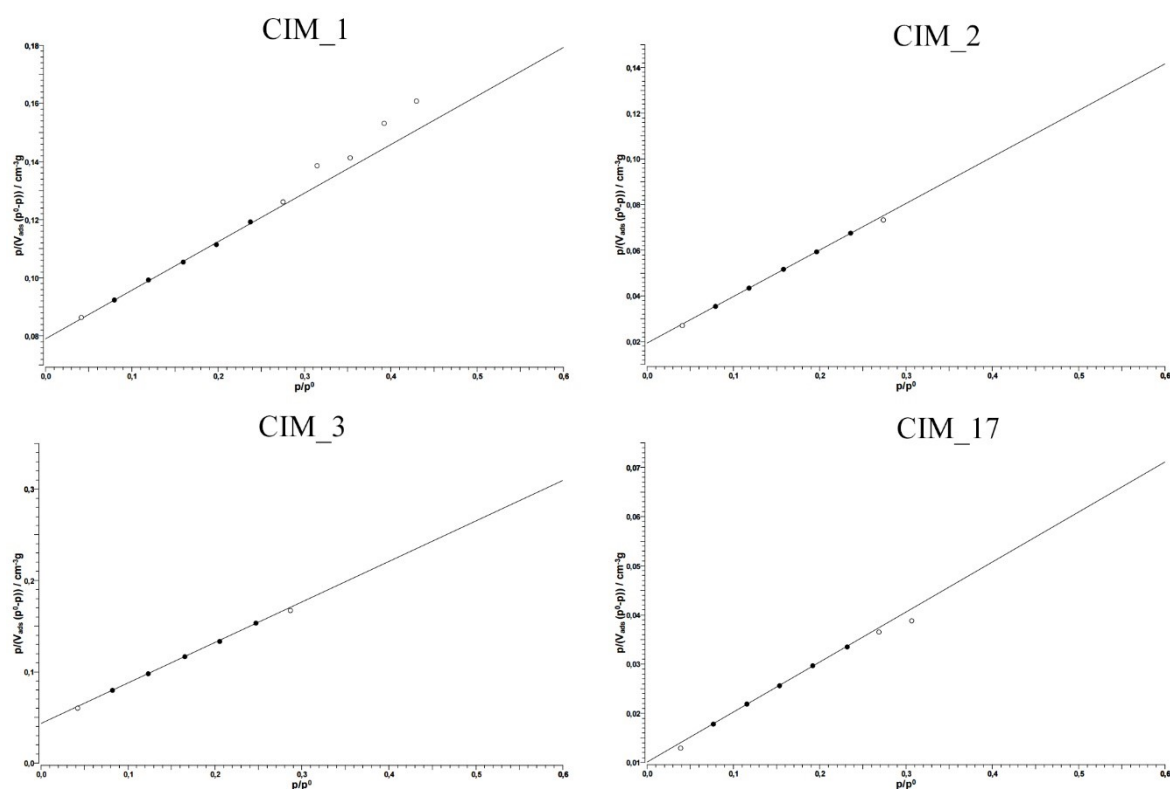
Specifický povrch byl změřen pro vzorky uvedené v Tabulce VIII. Změřen byl původní vzorek a vzorky z kulového a tryskového mletí, připravený vzorek ze superkritické fluidní extrakce se nepodařilo naměřit. Velikost měrného povrchu je závislá na velikosti částic. Čím menší částice jsou, tím větší je specifický povrch [47]

Tabulka VIII: Specifický povrch částic a PSD

vzorek	specifický povrch [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	PSD	
		průměrná velikost částic [nm]	modus [nm]
CIM_1	17,68	26716,7	-
CIM_2	19,51	12439,6	725,1
CIM_3	8,94	1691,7	1126,7
CIM_16	nezměřeno	nezměřeno	nezměřeno
CIM_17	38,96	382,5	343,6



Specifický povrch původního vzorku byl  $17,68 \text{ m}^2/\text{g}$ , průměrná velikost částic sice byla velká, ale vzhledem k široké distribuci velikosti částic měl vzorek velký měrný povrch. U vzorku CIM\_2, připraveného pomocí planetárního kulového mlýna, došlo ke zmenšení částic, a tím i ke zvětšení specifického povrchu na hodnotu  $19,51 \text{ m}^2/\text{g}$ . Tomu odpovídá modus (viz Tabulka VIII). Průměrná velikost částic je velice zkreslená, je to dáno polydisperzitou vzorku. U vzorku CIM\_3, který byl připraven planetárním kulovým mlýnem, vlivem delšího mletí vznikaly menší částice, u kterých docházelo k postupné agregaci, velikost specifického povrchu se výrazně zmenšila na hodnotu  $8,94 \text{ m}^2/\text{g}$ . U tryskového mletí, vzorek CIM\_17, byla naměřena nejvyšší velikost specifického povrchu  $38,96 \text{ m}^2/\text{g}$ , což je v souladu s naměřenou velikostí částic. Na Obrázku 21 jsou uvedeny BET křivky měřených vzorků, z jednotlivých závislostí byl stanoven specifický povrch (viz Tabulka VIII).



Obrázek 21: BET křivky CIM\_1 (původní vzorek), CIM\_2 (mletí planetárním kulovým mlýnem), CIM\_3 (mletí planetárním kulovým mlýnem), CIM\_17 (mletí tryskovým mlýnem) [47].



## 4.6 Testy rozpustnosti

Tyto testy jsou využívány k určení rychlosti uvolňování léčivé látky z lékové formy za použití disoluční aparatury. Disoluce léčiva probíhá v předepsaném disolučním médiu. Všechny tyto informace lze pro jednotlivé léčivé látky vyhledat v Českém lékopise. V této práci nebylo možné tyto testy provést z důvodu velmi malých množství připravených vzorků. Proto budou tyto testy provedeny v rámci navazující diplomové práce.

## 4.7 Diskuze

Pomocí analýzy SEM bylo zjištěno, že nejlépe se jevil při přípravě tryskový mlýn. Porovnáním snímku, bylo evidentní, že částice byly u tryskového mletí nejmenší. To se potvrdilo i výsledky z PSD. Tryskové mletí vykazovalo velmi úzkou distribuci velikosti částic. Průměrná velikost částic byla  $0,3\ \mu\text{m}$  a zároveň velikost specifického povrchu byla největší  $38,96\ \text{m}^2/\text{g}$ . Hodnota specifického povrchu původního vzorku cimetidinu byla  $17,68\ \text{m}^2/\text{g}$ . Problémem přípravy při tryskovém mletí bylo, že částice po mletí byly velmi nabitě a manipulace s nimi byla obtížná. Odebrání částic z tryskového mlýna bylo obtížné, protože částice zůstaly přichyceny na aparatuře. Proto při tryskovém mletí došlo k obrovským ztrátám. Výtěžek pomletého vzorku činil 30,2 %. Tryskový mlýn sice poskytuje nejmenší částice, ale je velmi ztrátový. Tato metoda je zároveň ekonomicky náročná.

Mletím v planetárním kulovém mlýně, se ukázalo, že doba mletí prodloužena na dvojnásobek způsobuje aglomeraci částic, což se projevilo výrazným zmenšením specifického povrchu. Při mletí, které probíhalo dva patnáctiminutové cykly, hodnota specifického povrchu byla  $19,51\ \text{m}^2/\text{g}$ , kdežto u dvojnásobné doby mletí byla hodnota specifického povrchu pouze  $8,94\ \text{m}^2/\text{g}$ . Výtěžek této metody byl 90,9 %. Pomocí XRD záznamů bylo zjištěno, že při mletí v tryskovém i planetárním kulovém mlýně, dochází ke změnám poměrů intenzit některých difrakcí, lze tedy očekávat určité strukturní změny. V rámci jednotlivých typů mletí se intenzity a polohy píků zachovávají. Vyhodnocením polymorfismu z FTIR spekter jsme došli k závěru, že procentuální zastoupení polymorfu B u tryskového mletí mělo hodnotu zápornou -0,19 %, dá se tedy předpokládat, že polymorf B se zde nenachází. U kulového mletí bylo zastoupení polymorfu B okolo 0,5 %. Zajímavé bylo, že procentuální zastoupení Z-izomeru bylo

u kulového mletí dokonce vyšší než u původního vzorku. Pro delší mletí bylo procentuální zastoupení Z-izomeru 5,46 % a 4,02 % pro mletí kratší. Pro tryskový mlýn bylo procentuální zastoupení Z-izomeru 1,03 %. Z porovnání rozpustnosti vychází lépe polymorf A než polymorf B [48].

Superkritická fluidní extrakce částic vykazovala nejlepší výsledky podle SEM snímků při nižších tlacích, kdy byla příprava provedena pro tlaky 150, 200 a 250 bar. To se ovšem u XRD nepotvrdilo, naopak zdá se, že čím vyšší tlak je nastaven, tím menší částice jsou připraveny. Čas statického módu byl nastaven na 20 a 40 min. Příprava probíhala i při různých teplotách (40, 50, 70°C). Na základě porovnání snímků ze SEM, velikost připravených částic byla při vyšších teplotách menší. Čím menší částice byly, tím měly větší tendenci k agregaci. Příprava při teplotě 70°C vykazovala vysokou míru agregace jehličkovitých částic. XRD záznamy tuto teorii nepotvrdily, z těchto záznamů vyplynulo, že teplota na velikost vliv nemá. Srovnání XRD záznamů vzorků připravených superkritickou fluidní extrakcí za stejných podmínek bylo zjištěno, že XRD záznamy byly nejspíše ovlivněny hlavně množstvím připravených vzorků. Dalo by se proto říci, že intenzita píků na výsledných XRD záznamech byla ovlivněna nikoli velikostí částic, ale množstvím připravených vzorků. Pro vzorky získané superkritickou fluidní extrakcí se nezdařilo naměřit PSD a specifických povrch z důvodu malých množství připravených vzorků. Podle FTIR záznamů bylo zjištěno, že přípravou pomocí superkritické fluidní extrakce, se u částic nacházelo kromě polymorfu A, jehož zastoupení u jednotlivých vzorků bylo okolo 97 %, přibližně 1 % polymorfu B a 1-3 % Z-izomeru. Nevýhodou při přípravě pomocí superkritické fluidní extrakce byla její časová náročnost. Připravené částice zůstávaly zachyceny na skelné vatě a skleněných kuličkách, což bylo spojeno s nemalými ztrátami. Tenhle problém je nevýhodou metody GAS v případě Speed SFE. Výhodou superkritické fluidní extrakce je snadná manipulace s přístrojem, snadné nastavení podmínek a také použití extraktoru pro více metod. Pro její další použití lze doporučit zvýšení navážky původního materiálu a další optimalizace podmínek použití.

## 5. Závěr

Tato práce byla zaměřena na přípravu submikronových částic a nanočástic cimetidinu. Práce se z teoretické části zabývala léčiv, jejich vlastnostmi a biodostupností. Zvýšení biodostupnosti je možné pomocí redukce velikosti částic, proto je práce zaměřená na možné metody mikronizace. Jednou ze stěžejních metod, kterou se práce zabývala jak v teoretické, tak i v praktické části, byla superkritická fluidní extrakce. Z důvodu potenciálního využití v budoucnu byl z léčiv vybrán cimetidin, jehož submikronové částice a nanočástice se podařilo připravit pomocí kulového mletí, tryskového mletí i superkritické fluidní extrakce. Všechny připravené částice byly analyzovány pomocí SEM, FTIR, XRD, PSD. Změřen byl i specifický povrch připravených částic. Nejlépe se jevila příprava pomocí tryskového mlýna, ovšem tato metoda je velice ztrátová a ekonomicky náročná. Superkritická fluidní extrakce představuje velmi zajímavou metodu s velkým potenciálem.

V rámci navázání na tuto práci by bylo dobré se zaměřit u superkritické fluidní extrakce na použití větších navážek a získání tak větší výtěžnosti pomocí této metody. Bylo by dobré provést testy rozpustnosti a prokazatelně zjistit vliv velikosti částic na biodostupnost.

## 6. Literatura

- [1] Zákon o léčivech. [Online]. [cit. 10. 5. 2016]. Dostupné z: <<http://www.sukl.cz/sukl/legislativa-ceske-republiky>>.
- [2] Nencka, R. *Základní principy výzkumu nových léčiv*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015, 128 s: s. 6-8. ISBN 978-80-244-4538-0.
- [3] Hampl, F. – Rádl, S. – Paleček, J. *Farmakochemie*. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015, 639 s: s. 15-19, 27-28, 29-31, 31-32. ISBN 978-80-7080-875-7.
- [4] Komárek, P. – Rabišková, M. *Technologie léků*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006, 399 s. ISBN 80-7262-423-7.
- [5] *Léčivo*. [Online]. [cit. 14. 4. 2016]. Dostupné z: <<https://cs.wikipedia.org/wiki/Léčivo>>.
- [6] *The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance*. [Online]. [cit. 10. 11. 2015]. Dostupné z: <<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm>>.
- [7] Vaňková, D. *Chemie léčiv*. 1. vyd. Ostrava: Pavko, 2012, 93 s: s 15-16, 13-15. ISBN 978-80-86369-15-0.
- [8] Keprtová, L. *Základy chemie léčivých látek*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, 133 s: s. 9-10, 32-34. ISBN 978-80-244-3797-2.
- [9] *Biodostupnost*. [Online]. [cit. 14. 4. 2016]. Dostupné z: <<https://cs.wikipedia.org/wiki/Biodostupnost>>.

- [10] Perrut, M. - Jung, J. – Leboeuf, F. *Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by Supercritical Fluid processes. Part I: Micronization of neat particles.* International Journal of Pharmaceutics, 288, 2005, s. 3-10.
- [11] Savjani, K. T. - Anuradha, K. G. -Savjani, J. K. *Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques.* ISRN Pharmaceutics. 2012, 11 s. ISSN 2090-6153.
- [12] Kakran, M. - Sahoo, N. G. - Li, L. - Judeh, Z. - Wang, Y. – Chong, K. – Loh, L. *Fabrication of drug nanoparticles by evaporative precipitation of nanosuspension.* International Journal of Pharmaceutics. 383 (1-2), 2010, s. 285-292.
- [13] Hartl, J. – Palát, K. *Farmaceutická chemie I.* 3. vyd. Praha: Karolinum, 2011, 102 s: s. 5-6, 90-99. ISBN 978-80-246-2033-6.
- [14] Novák, J. *Fyzikální chemie.* 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 2001, s. 319.
- [15] Kuchař, M. *Výzkum a vývoj léčiv.* 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2008, 166 s: 61-72. ISBN 978-80-7080-677-7.
- [16] Liversidge, G. G. – Cundy, K. C. *Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs.* International Journal of Pharmaceutics. 125(1), 1995, s. 91-97. ISSN 03785173.
- [17] Horter, D. – Dressman, J. B. *Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract.* Advanced Drug Delivery Reviews. 46(1-3), 2001, s. 75-87.
- [18] Aulton, A. - Michael, E. *Pharmaceutics: the science of dosage form design.* 2. vyd. Churchill Livingstone, 2001, 699 s. ISBN 9780443055171.
- [19] Khadka, P. - Ro, J. - Kim, H. *Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability.* Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014, 9(6), s. 304-316. ISSN 18180876.

- [20] *Drug Bioavailability*. [Online]. [cit. 10. 11. 2015]. Dostupné z: <<http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-bioavailability#v6524384>>.
- [21] Munjal, Y. P. *API textbook of medicine*. 9. vyd. Mumbai: Association of Physicians of India. 2012, 3038 s: s. 214. ISBN 9350250748.
- [22] Ruell, J A. – Tsinman, K. L. – Avdeef, A. *PAMPA - a drug absorption in vitro model*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 20(4-5), 2003, s. 393-402. ISSN 09280987.
- [23] *Permeability*. [Online]. [cit. 25. 4. 2016]. Dostupné z: <<http://www.pion-inc.com/Products/Permeability/en>>
- [24] *Cimetidine*. [Online]. [cit. 13. 10. 2015]. Dostupné z: <<http://livertox.nlm.nih.gov/Cimetidine.htm>>.
- [25] Kubecova, M. – Kolostova, K. - Pinterova, D. - Kacprzak, G. – Bobek, V. *Cimetidine: An anticancer drug?* European Journal of Pharmaceutical Sciences. 42(5), 2011, 439-444.
- [26] *Český lékopis 1997*. [Online]. [cit. 13. 10. 2015]. Dostupné z: <<http://www.lekopis.cz/>>.
- [27] *Cimetidine*. [Online]. [cit. 13. 10. 2015]. Dostupné z: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2654.html?rid=d22b849f-a976-47a5-9126-940a809c1711>>.
- [28] Calvo, N. L. - Maggio, M.R. – Kaufman, T.S. *A dynamic thermal ATR-FTIR/chemometric approach to the analysis of polymorphic interconversions. Cimetidine as a model drug*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 92, 2014, 90-97.
- [29] Vandana, K. R. - Raju, P. Y. - Chowdary, H. V. – Sushma, M. – Kumar, V. N. *An overview on in situ micronization technique – An emerging novel concept in advanced drug delivery*. Saudi Pharmaceutical Journal. 22 (4), 2014, s. 283-289. ISSN 13190164.

- [30] Jalay, J. T. *A review on micronization techniques*. Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 3 (7), 2011, s. 31. ISSN 0975-5772.
- [31] Jančar, D. *Zařízení keramických závodů*. VŠB – Technická univerzita Ostrava. 2013, 121 s. ISBN 978-80-248-3370-5
- [32] Loh, Z. H. - Samanta, A. K. - Sia Heng, P. W. *Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 10(4), 2015, s. 255-274. ISSN 18180876
- [33] Afolabi, A. – Akinlabi, O. – Bilgili, E. *Impact of process parameters on the breakage kinetics of poorly water-soluble drugs during wet stirred media milling: A microhydrodynamic view*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 51, 2014, s. 75-86. ISSN 09280987
- [34] Niwa, T. – Nakanishi, Y. - Danjo, K. *One-step preparation of pharmaceutical nanocrystals using ultra cryo-milling technique in liquid nitrogen*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 41(1), 2010, s. 78-85. ISSN 09280987.
- [35] Han, X. - Ghoroi, CH. - To, D. - Chen, Y. - Davé, R. *Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles*. International Journal of Pharmaceutics, 415 (1–2), 2011, s 185-195.
- [36] Mahesh, K. V. - Singh, S. K. – Gulati, M. *A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nanosuspensions of glipizide*. Powder Technology. 256, 2014, s. 436-449. ISSN 00325910.
- [37] Bilati, U. - Allémann, E. – Doelker, E. *Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 24(1), 2005, s. 67-75. ISSN 09280987
- [38] Thorat, A. A. – Dalvi, S. V. *Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective*. Chemical Engineering Journal. 181-182, 2012, s. 1-34. ISSN 13858947.

- [39] Ghaderi, R. *A supercritical fluids extraction process for the production of drug loaded biodegradable microparticles*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2000. ISBN 9155448003.
- [40] Tabarnero, A. – Martin Del Valle, E. M. - Galán, M. A. *Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling*. Chemical Engineering and Processing, 60, 2012, s. 9-25. ISSN 02552701.
- [41] Knez, Ž. - Markočič, E. - Leitgeb, M. - Primožič, M. - Knez Hrnčič, M. – Škerget, M. *Industrial applications of supercritical fluids: A review*. Energy. 77, 2014, s. 235-243. ISSN 03605442
- [42] Jung, J. - Perrut, M. *Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey*. The Journal of Supercritical Fluids. 20(3), 2001, s. 179-219. ISSN 08968446.
- [43] Byrappa, K. – Ohara, S. - Adschiri, T. *Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2008, 60(3), s. 299-327.
- [44] Supercritical fluid extraction. [Online]. [cit. 10. 5. 2016]. Dostupné z: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Supercritical\\_fluid\\_extraction](https://en.wikipedia.org/wiki/Supercritical_fluid_extraction)>.
- [45] Stuchlík, Petr. *Preparation of submicron particles and nanoparticles of biologically active compounds using supercritical fluid*. Ostrava, 2015. s. 54.
- [46] Baránska, M. – Proniewicz, L. M. *FT-IR and FT-Raman spectra of cimetidine and its metal complexes*. Journal of molecular structure. 1999, s. 153-162.
- [47] Klika, Z. – Ritz, M. – Študentová, S. *Strukturní a texturní analýza, studijní opora*. VŠB – TUO. 2013, s. 127.
- [48] Sudo, S. - Sato, K. - Harano, Y. *Solubilities and crystallization behavior of cimetidine polymorphic forms A and B*. Journal of chemical engineering of Japan. 1991, s. 237-242.